



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**INFECÇÃO POR VÍRUS DENGUE: FITOTERAPIA COMO  
TRATAMENTO E PROFILAXIA**

Trabalho submetido por  
**Tiago Alexandre Pena Santos**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**fevereiro de 2018**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **INFEÇÃO POR VÍRUS DENGUE: FITOTERAPIA COMO TRATAMENTO E PROFILAXIA**

Trabalho submetido por  
**Tiago Alexandre Pena Santos**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho**

**fevereiro de 2018**



## **Agradecimentos**

Esta monografia encerra um capítulo importante na minha formação académica e profissional. Por este motivo, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a sua realização.

Deste modo, quero prestar os meus agradecimentos à Professora Doutora Guilhermina Moutinho pela orientação científica desta dissertação. Agradeço também todas as suas contribuições e a disponibilidade para ajudar nesta etapa.

Agradeço também à Professora Ana Pintão e ao Professor Nuno Taveira pela disponibilidade demonstrada e partilha de informações essenciais no âmbito da fitoterapia e do vírus, respetivamente.

À minha namorada, Joana, pelo carinho, compreensão, apoio incondicional em todas as fases da realização da tese, desde da edição das figuras até à formatação da monografia, bem como pelo encorajamento nos dias mais negros. És o meu “porto seguro”!

Aos meus amigos, que me ajudaram em várias fases do meu percurso académico.

Por último, um agradecimento muito especial à minha família.

Ao meu tio, Miguel, pelo apoio que me tem dado em diferentes fases da minha vida, com destaque para a formação académica.

Aos meus avós, Leonor, Adriano, Arminda e Ademar, por toda a preocupação e pelas palavras de carinho que têm demonstrado em vários capítulos da minha vida, incluindo na formação académica.

Aos meus pais, Leonor e Ademar, por todo o amor irrefutável e dedicação em todo o meu percurso pessoal e profissional. Sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, conquistas e derrotas. Sem eles não seria quem sou.

A todos vós, muito obrigado!



## Resumo

A infecção por vírus dengue consiste numa arbovirose categorizada como uma das principais responsáveis pela morbidade e mortalidade constatadas nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente nos países pertencentes à Ásia e à América Central e do Sul.

A disseminação dos vetores e do vírus tem crescido nos últimos anos devido a várias condições como alterações climáticas, aumento de viagens para países endêmicos e urbanização. Várias medidas têm sido efetuadas no âmbito da mitigação de ambos os fatores, como a implementação de técnicas de controlo químico e biológico para os mosquitos e recentemente a vacinação contra o vírus, existente em vários países endêmicos. Contudo, devido ao uso excessivo de métodos químicos nos mosquitos e à inexistência de agentes antivirais, tem-se pesquisado e desenvolvido estratégias alternativas, nomeadamente a utilização de plantas medicinais.

A fitoterapia constitui uma área que combina conhecimento tradicional com métodos de pesquisa e desenvolvimento fitoquímico, com o intuito da criação de novas abordagens terapêuticas e profiláticas. Plantas medicinais como *Cissampelos pareira* Linn compreende atividades farmacológicas muito distintas, desde ação analgésica e antipirética até antivírica. O progresso científico alcançado nesta área pode criar uma cura para esta patologia.

Palavras chave: Vírus dengue; Fitoterapia; *Cissampelos pareira* Linn; Cura





## Abstract

Dengue virus infection consists in an arbovirosis categorized as one of the main causes of morbidity and mortality found in tropical and sub tropical regions, especially in countries belonging to Asia and Central and South America.

The dissemination of the vectors and the virus has increased in last years due to several conditions, as climate changes, rising of travels to endemic countries and urbanization. Several measures have been taken in the context of mitigation of both factors, as the implementation of chemical and biological controls for the mosquitoes and recently the vaccination against the virus, which existis in several endemic countries. However, due to the excessive use of chemical methods in the mosquitoes and in the absence of antiviral agents, it has been researched and developed alternative strategies, namely the use of medicinal plants.

Phytotherapy constitutes an area that combines tradicional knowledge with phytochemical research and development methods, in order to create new therapeutic and prophylactic approaches. Medicinal plants, as *Cissampelos pareira* Linn comprise distinct pharmacological activities, from analgesic and antipyretic to antiviral actions, required for the treatment and prevention of the infection. The scientific progress achieved in this area can create a cure for this pathology.

Keywords: Dengue virus; Phytotherapy; *Cissampelos pareira* Linn; Cure



## ÍNDICE GERAL

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. VÍRUS DENGUE .....</b>	<b>17</b>
3.1. Serotipos .....	17
3.1.1. DENV-1.....	17
3.1.2. DENV-2.....	18
3.1.3. DENV-3.....	18
3.1.4. DENV-4.....	19
3.1.5. DENV-5.....	19
3.2 Origem do vírus dengue.....	20
3.3. Estrutura e genoma.....	23
3.4. Proteínas estruturais e não estruturais .....	24
3.5. Entrada e replicação viral na célula hospedeira.....	29
<b>4. TRANSMISSÃO DO DENV.....</b>	<b>34</b>
<b>5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÉNESE.....</b>	<b>45</b>
<b>6. DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. TRATAMENTO CONVENCIONAL .....</b>	<b>58</b>
<b>8. ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO .....</b>	<b>62</b>
8.1. Aplicações no vetor.....	62
8.1.1. Métodos químicos.....	62
8.1.2 Métodos Biológicos.....	64
8.2. Aplicações para o Homem .....	65

8.2.1. Vacinação.....	65
8.2.2. Proteção individual e de habitação .....	66
<b>9. FITOTERAPIA COMO TRATAMENTO E PROFILAXIA.....</b>	<b>69</b>
9.1. Plantas medicinais com principal relevância em fitoterapia como tratamento e profilaxia para a infecção por DENV.....	69
9.1.1. <i>Cissampelos pareira</i> Linn .....	69
9.1.2. <i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal .....	75
9.1.3. <i>Corymbia citriodora</i> (Hook) K.D.Hill & L.A.S Johnson .....	76
<b>10. CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Extensão geográfica dos países de maior risco de transmissão do vírus dengue.....	15
<b>Figura 2:</b> Ciclos de transmissão do vírus dengue .....	20
<b>Figura 3:</b> Estrutura de uma partícula do vírus dengue.....	23
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo do genoma de ARN viral.....	24
<b>Figura 5:</b> Homodímero da glicoproteína E.....	26
<b>Figura 6:</b> Organização das proteínas estruturais e da proteína não estrutural NS1 na membrana do retículo endoplasmático.....	31
<b>Figura 7:</b> Ciclo de replicação do DENV.....	33
<b>Figura 8:</b> Principais mosquitos transmissores do DENV.....	36
<b>Figura 9:</b> Distribuição de <i>A. aegypti</i> na Europa.....	37
<b>Figura 10:</b> Distribuição de <i>A. albopictus</i> na Europa.....	39
<b>Figura 11:</b> Ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> .....	41
<b>Figura 12:</b> Representação dos frutos, folhas e caules de <i>C. pareira</i> L.....	70
<b>Figura 13:</b> Representação dos frutos de <i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal em comparação com o fruto de tomate de cultivo ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) .....	75
<b>Figura 14:</b> Folhas de <i>C. citriodora</i> (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson .....	77

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1:** Doenças infecciosas e não infecciosas a considerar aquando da realização de um diagnóstico diferencial de uma infeção por DENV..... 53

**Tabela 2:** Critérios laboratoriais para infeções confirmadas ou prováveis, tipo de amostras utilizadas, metodologia correspondente e vantagens e desvantagens dos mesmos..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Microgramas

*A. aegypti* - *Aedes aegypti*

*A. albopictus* - *Aedes albopictus*

ADE - Imunoamplificação dependente de anticorpos (do inglês: *antibody-dependent enhancement*)

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AG129 - Modelo de ratinho sem receptores para o interferão alfa-beta e para o interferão gama

ARN - Ácido ribonucleico

Bti - *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

C - Proteína da Cápside

C3 e C5 - Proteínas do Sistema do Complemento

C6/36 - Linhagem celular derivada de *Aedes albopictus*

CC<sub>50</sub> – Concentração máxima citotóxica necessária para inviabilizar 50% das células em estudo

DC-SIGN - Recetor não integrino captador da molécula de adesão intercelular 3 específica das células dendríticas (do inglês: *C-type lectin dendritic cells specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*)

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DEET - N,N-dietil-meta-toluamida

DENV - Vírus dengue (do inglês: *dengue virus*)

DENV 1-5 - Serotipos do vírus dengue do 1 ao 5

DML - Dose letal mínima

dsRNA - Ácido ribonucleico de cadeia dupla (do inglês: *double strand ribonucleic acid*)

E - Proteína do Invólucro

EPA - Agência de Proteção do Ambiente dos Estados Unidos da América (do inglês: *United States Environmental Protection Agency*)

Fcγ - Recetor para a Porção Constante dos Anticorpos G

FD - Febre de dengue

FHD - Febre hemorrágica por dengue

HepG2 – Células epiteliais humanas de carcinoma hepático

Huh-7 - Culturas celulares de carcinoma hepático humanas

IC<sub>50</sub> - Concentração necessária para inibir 50% de uma determinada população

IgM - Imunoglobulina M

IgG - Imunoglobulina G

IR 3535<sup>®</sup> - Etilbutilacetilaminopropionato

Kg - Quilograma

LLCMK2 - Linhagem celular derivada do rim de macacos *Rhesus*

LOAEL - Dose mínima necessária para observação de efeitos adversos (do inglês: *Lowest Observed Adverse Effect Level*)

LOEL - Dose mínima necessária para observação de efeitos (do inglês: *Lowest Observed Effect Level*)

log - Logaritmo

M - Proteína da Membrana

mABS - Anticorpos monoclonais (do inglês: *Monoclonal antibodies*)

MAC-ELISA - Ensaio imunoenzimático de determinação de Anticorpos M

mg – Miligramas

ml- Mililitros

mm - Milímetros

mm<sup>3</sup> - Milímetros cúbicos

MTPase - Domínio de metiltransferase

NK - Células *natural killer*



NO - Óxido nítrico (do inglês: *Nitric oxide*)

NOAEL - Dose sem efeitos adversos observáveis (do inglês: *No Observed Adverse Effect Level*)

NOEL - Dose sem efeitos observáveis (do inglês: *No Observed Effect Level*)

NS - Proteína Não Estrutural (do inglês: *Non-structural protein*)

NTD - Doenças Tropicais Negligenciadas (do inglês: *Neglected Tropical Diseases*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - Fase de leitura aberta (do inglês: *Open Reading Frame*)

pb - Pares de bases

PMD - para-metano-3,8-diol

prM - Proteína Precursora da Membrana

PRNT - Ensaio de neutralização de redução em placas (do inglês: *Plaque reduction neutralizing test*)

PRNT<sub>50</sub> - Concentração de soro ou extrato vegetal necessária para reduzir o número de placas em 50%

RdRp - Polimerase de ARN dependente de ARN

RE - Retículo endoplasmático

REVIVE - Rede Nacional de Vigilância de Vetores

RT-PCR - Reação de Polimerização em Cadeia com Transcriptase Reversa

SCD - Síndrome de choque por dengue

SLA - Promotor *stem-loop A*

SLB - *Stem-loop B*

STAT 2 - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 2

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TOT - Transmissão vertical (do inglês: *Transovarial transmission*)

UFP - Unidades Formadoras de Placas

Vero - Culturas celulares renais de primatas

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

YF-17D - Vacina viva atenuada do vírus da febre amarela

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (NTD) consistem num grupo de infeções de origem bacteriana, parasitária, viral e fúngica prevalente em países subdesenvolvidos de regiões tropicais e subtropicais em situação de pobreza eminente. Nestes países, as NTD contribuem não só para a degradação do estado de saúde dos indivíduos infetados, como também para a precariedade socioeconómica do país em causa, visto que ao impedir que as pessoas exerçam uma determinada profissão, verifica-se um decréscimo do seu rendimento económico e, por consequência, há uma perpetuação do ciclo de pobreza (Mitra & Mawson, 2017).

De entre as várias NTD, vinte no seu conjunto, com um custo para os sistemas de saúde avaliado em mais de 7 mil milhões de euros e cuja carga global da doença está quantificada em 25,5 anos de vida saudável perdidos por cada 100.000 habitantes, destaca-se a infeção por vírus dengue, que é transmitida por mosquitos do género *Aedes*. Das espécies deste género destacam-se as espécies *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse)* por serem as principais responsáveis pela proliferação do vírus (Katzelnick, Coloma, & Harris, 2017; Mitra & Mawson, 2017; Summers, 2016).

Apesar do vírus dengue ser característico de regiões tropicais e subtropicais, que apresentam ambientes propícios à sua disseminação, constatou-se que também foi responsável por surtos recentes que ocorreram em áreas não endémicas, como nos Estados Unidos da América e nalguns países da Europa, nomeadamente Portugal. Acredita-se que tal tenha acontecido devido, principalmente, a viajantes oriundos dos países endémicos e às alterações climáticas registadas nas últimas décadas que têm permitido a expansão dos vetores (Domanovic *et al.*, 2012; Katzelnick *et al.*, 2017).

Assim, devido à pertinência de controlar a incidência, distribuição e impacto clínico a nível mundial, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu várias metas para 2020. Essas metas consistem na redução da mortalidade e da morbilidade para no mínimo, 50% e 25%, respetivamente, nos países endémicos. De forma a concretizar estes objetivos, diversos esforços têm sido feitos como por exemplo: criação de novos métodos de controlo vetorial, educação da população, licenciamento da primeira vacina tetravalente contra o vírus entre outros (Pang, Mak, & Gubler, 2017; Summers, 2016; World Health Organization, 2012).

Não obstante a existência de mecanismos de prevenção e controle, o desenvolvimento de um tratamento antiviral eficaz continua a ser uma das prioridades da OMS (Da Silveira Oliveira *et al.*, 2017).

Uma das abordagens utilizadas para a resolução desta questão consiste na utilização de plantas medicinais, dado que são, por exemplo, uma fonte de inúmeras substâncias com atividade terapêutica e que podem ser produzidas por culturas biotecnológicas. Conforme estudos efetuados pela OMS, 80% da população de alguns países asiáticos e africanos depende exclusivamente da medicina tradicional como cuidado de saúde primário, demonstrando a importância do conhecimento etnobotânico, nomeadamente no tratamento antivirico (Abd Kadir, Yaakob, & Zulkifli, 2013; Da Silveira Oliveira *et al.*, 2017).

Em relação ao controle dos mosquitos, a maioria das substâncias usadas baseiam-se em organofosfatos e reguladores do crescimento dos artrópodes, como diflubenzuron e metopreno. Estes compostos são responsáveis pela aquisição de resistência por parte de *A. aegypti*. Por este motivo, torna-se necessário investir em compostos que não sejam nocivos para o ambiente, como substâncias biocidas à base de plantas (Rocha *et al.*, 2015).

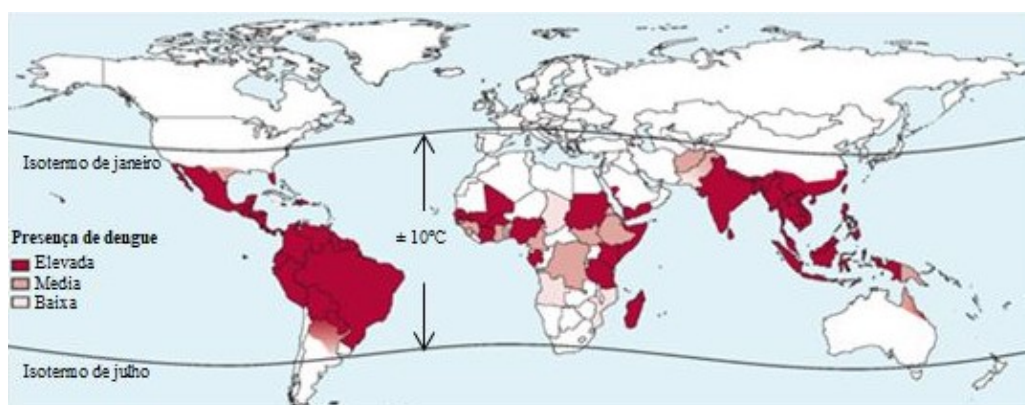
Deste modo, a investigação e desenvolvimento de substâncias antivíricas e inseticidas não nocivas para o Homem e sem risco ambiental é de extrema importância para mitigar o risco de transmissão do vírus (Abd Kadir *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2015).

Para a concretização da seguinte monografia recorreu-se às seguintes bases de dados: PubMed, Google Académico, Organização Mundial de Saúde, *Centers for Disease Control and Prevention*, Lens.org, Organização Mundial de Propriedade Intelectual, *ResearchGate*, MDPI, *American Society for Microbiology*, *Science Direct*, *The Lancet*, entre outras. De forma a realizar uma pesquisa mais orientada, foram selecionadas algumas palavras chave em Inglês, como as seguintes apresentadas: “dengue”, “dengue epidemiology”, “dengue vectors”, “dengue treatment”, “dengue diagnosis”, “prevention of dengue” e “dengue phytotherapy”. A pesquisa, levantamento e seleção de informação sobre o tema proposto efetuou-se no período decorrido entre agosto de 2017 e fevereiro de 2018.

## 2. EPIDEMIOLOGIA

Atualmente, a doença provocada por dengue consiste na arbovirose mais prevalente no Homem e de mais rápida disseminação, onde nos últimos 50 anos a incidência aumentou cerca de 30 vezes (Katzelnick *et al.*, 2017; Pang *et al.*, 2017). De acordo com Bhatt *et al.* (2013), estima-se que 3,6 bilhões de habitantes estão potencialmente expostos à transmissão da infecção pelo vírus dengue, e com um número estimado de 390 milhões de indivíduos infectados, dos quais 96 milhões apresentam manifestações clínicas (Bhatt *et al.*, 2013). A OMS estima ainda que 500.000 indivíduos por ano são hospitalizados com FHD e SCD, dos quais 12.500 (2,5%) representam óbitos (WHO, 2017).

A doença é endêmica em mais de 100 países tropicais e subtropicais, pertencentes a África, América Central e do Sul, Este Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Oeste do Pacífico, representado na Figura 1 (WHO, s.d.a).



**Figura 1:** Extensão geográfica dos países de maior risco de transmissão do vírus dengue. As linhas de contorno preto dos isotermos de janeiro e julho indicam os limites geográficos dos hemisférios norte e sul, respetivamente, para o mosquito *A. aegypti*. O gradiente de temperatura, representado entre as duas linhas de contorno, dos dois isotermos é de 10°C. (Adaptado de: Guzman & Harris, 2015)

De todas as regiões endêmicas, o Oeste do Pacífico, Sudeste Asiático e América Central e do Sul, consistem nas áreas de maior risco de transmissão do vírus dengue (Guo *et al.*, 2017).

A título de exemplo, em 2016, segundo a OMS, só na América Central e do Sul foram reportados 2,38 milhões de casos de infecção por dengue, onde apenas o Brasil

contribuiu aproximadamente em 1,5 milhões de casos. No Oeste do Pacífico descreveram-se mais do que 375.000 ocorrências, das quais 176.411 pertencem às Filipinas, enquanto no Sudeste Asiático, unicamente na Malásia, houve 100.028 incidências (WHO, 2017).

O elevado risco de transmissão deve-se ao facto destas regiões serem endémicas assim como hiperendémicas, isto é, onde co circulam vários serotipos, podendo provocar reinfeções por dengue e agravar a sintomatologia dos episódios (Esteves & Parreira, 2014).

### 3. VÍRUS DENGUE

O vírus dengue (DENV) é membro da família Flaviviridae e do género *Flavivirus*. O género *Flavivirus* inclui outros vírus igualmente importantes, encontrados em muitas partes do mundo, como é o caso do vírus Zika, vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa e do vírus do Oeste do Nilo (Centers for Disease Control and Prevention, 2014).

#### 3.1 Serotipos

O vírus dengue é constituído por cinco serotipos, DENV 1-5. Cerca de 60% do genoma é semelhante entre os primeiros 4 serotipos. Dentro de cada serotipo existe ainda variabilidade genética, isto é, um subtipo pode ser subclassificado em diferentes genótipos, com distribuições geográficas distintas. Porém, a diferenciação em vários grupos filogenéticos é aplicável apenas aos serotipos 1-4, uma vez que para o DENV-5 ainda não existe informação detalhada acerca da sua sequência genómica (Dwivedi, Tripathi, Tripathi, Bharadwaj & Mishra, 2017; Wang *et al.*, 2015).

##### 3.1.1 DENV-1

Segundo a classificação filogenética que se baseia nas sequências de nucleótidos, o DENV-1 é constituído por seis genótipos. O **genótipo I** é composto por estirpes oriundas do Sudeste Asiático, China e África Ocidental; o **genótipo II**, com estirpes da Tailândia; o **genótipo III**, que abrange linhagens selvagens e endémicas derivadas da Malásia; o **genótipo IV**, representado por estirpes da Austrália e Ilhas do Oeste do Pacífico; e o **genótipo V**, que compreende todas as estirpes do continente africano, estirpes da África Ocidental e algumas estirpes da Ásia (Pyke *et al.*, 2016; Weaver & Vasilakis, 2009).

Mais recentemente observou-se a existência de um novo genótipo (VI), originário do Brunei, Ásia. Esta estirpe selvagem demonstra ser a mais diferenciada de todos os genótipos para o serotipo 1, divergindo nas sequências nucleotídicas da região codificante do genoma em 17,9%, ao passo que os restantes genótipos se diferenciam em 6% (Pyke *et al.*, 2016; Weaver & Vasilakis, 2009). Obteve-se também resultados idênticos para o gene que codifica para a proteína do invólucro lipídico, que é responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira. Ao mesmo tempo, a análise filogenética demonstrou que o **genótipo VI** divergiu do ancestral comum do DENV-1

há 315 anos, ao contrário dos outros genótipos, que se diferenciaram há 120 anos (Pyke *et al.*, 2016).

Este serotipo foi responsável pelo surto de dengue ocorrido no Arquipélago da Madeira em 2012. O DENV-1 é prevalente em estados membros da Comunidade dos Países da Língua Portuguesa, como Brasil, Cabo Verde e Angola, e como nestes países o fluxo imigratório para Portugal é elevado, subsiste a preocupação de contrair possíveis infeções (Alves *et al.*, 2013; Domanovic *et al.*, 2012).

### 3.1.2 DENV-2

Através da sequenciação do gene que codifica para a proteína do invólucro lipídico, em termos filogenéticos o DENV-2 é composto por seis genótipos.

O primeiro genótipo é denominado por **genótipo asiático I**, que é constituído por estirpes da Malásia, Tailândia, Camboja, Myanmar, Vietname e Austrália. O segundo genótipo designa-se por **genótipo asiático II**, que representa estirpes da China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México. O terceiro genótipo chama-se **genótipo do sudeste asiático/americano** e abrange todas as estirpes isoladas do Sudeste Asiático e estirpes da América Central, do Sul e Caraíbas. O quarto genótipo é intitulado de **genótipo cosmopolita** e apresenta estirpes com uma distribuição geográfica mais ampla, incluindo Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Pacífico e do Índico, Índia e Médio Oriente. O quinto genótipo designa-se de **genótipo americano** e é representado por estirpes da América Central e do Sul e estirpes ancestrais da Índia e das Ilhas do Pacífico. Por último o sexto genótipo é considerado como o **genótipo indígena** e compreende isolados derivados dos ciclos entre humanos, mosquitos e primatas na África Ocidental e Sudeste Asiático (Chen & Vasilakis, 2011).

### 3.1.3 DENV-3

Em conformidade com estudos filogenéticos estão descritos cinco genótipos para o DENV-3. O **genótipo I** possui estirpes oriundas da Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Sul do Pacífico. O **genótipo II** representa estirpes derivadas da Tailândia, Bangladesh, Malásia, Myanmar, Vietname e Camboja. O **genótipo III** é constituído por isolados do Sri Lanka, Índia, Samoa, África e de todo o continente americano. O **genótipo IV** compreende estirpes com origem de Porto Rico. Por fim, o **genótipo V** que abrange isolados das Filipinas, Japão e China (Araújo, Bello,



Schatzmayr, Santos, & Nogueira, 2009; Virus Pathogen Database and Analysis Resource, 2017).

#### 3.1.4 DENV-4

De todos os serotipos descritos, o serotipo 4 é o que apresenta menos genótipos, quatro no total. O **genótipo I** é constituído por estirpes das Filipinas, Tailândia, Vietname, Myanmar, Malásia, Sri Lanka e Índia, bem como casos importados da China, Japão e Brasil. O **genótipo II** é composto por estirpes da Indonésia, Malásia, Singapura, China, Austrália, Ilhas do Oeste do Pacífico, América Central e do Sul e Caraíbas, encontrando-se bem disseminado nestas duas últimas áreas, desde a sua introdução nos anos 80. O **genótipo III** é representado por estirpes derivadas da Tailândia, diferentes de todos os outros isolados tailandeses. E finalmente o **genótipo IV**, que inclui as três linhagens selvagens oriundas da Malásia. Estas linhagens selvagens representam o genótipo ancestral, na medida em que são geneticamente diferenciadas dos restantes genótipos (I-III), que integram o ciclo de transmissão endémico, e constituem a fundação para a divergência nos quatro genótipos (Chen & Vasilakis, 2011).

#### 3.1.5 DENV-5

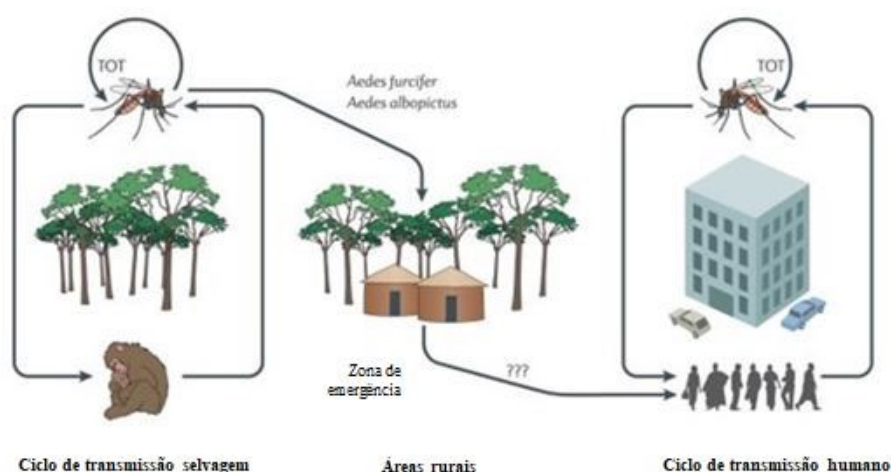
Em outubro de 2013, o DENV-5 foi identificado a partir de uma amostra de sangue colectada de um agricultor aquando de um surto de dengue na região de Sarawak, Malásia, em 2007. Atualmente desconhece-se a sua existência noutras regiões do globo (Mustafa, Rasotgi, Jain, & Gupta, 2015).

### 3.2 Origem do vírus dengue

A transmissão do DENV compreende dois ciclos distintos, ciclo endêmico/epidêmico e ciclo zoonótico ou selvagem (Figura 2). No ciclo endêmico/epidêmico, a transmissão sucede-se entre o Homem e os mosquitos das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*, podendo também, em situações menos frequentes, ser transmitido via transfusão sanguínea, transplante ou placentária. Pelo contrário, no ciclo zoonótico ou selvagem, a transmissão decorre entre os hospedeiros primatas e outras espécies de vetores do género *Aedes* spp. que não as mencionadas anteriormente (Guzman & Istúriz, 2010; Wang *et al.*, 2000).

Em ambos os ciclos, os mosquitos fêmea infetados podem transmitir o vírus às gerações futuras por transmissão vertical (TOT) (Figura 2). Este mecanismo providencia uma possível explicação de como o DENV subsiste na natureza na ausência de hospedeiros ou em condições adversas para a reprodução e desenvolvimento dos vetores. Todavia, desconhece-se o impacto deste fenómeno em termos epidemiológicos da doença (Grunnill & Boots, 2016; Martins *et al.*, 2012).

Nos territórios rurais das florestas tropicais do Sudeste Asiático e de África Ocidental, ou seja, na interface entre o ambiente selvagem e áreas peridomésticas, que contêm uma densidade populacional de vetores transmissores do vírus elevada, como *A. furcifer* e *A. albopictus* (Figura 2), as estirpes selvagens do DENV podem ser transmitidas às populações humanas. Às áreas circundantes destes locais dá-se o nome de “zonas de emergência” (Figura 2) (Chen & Vasilakis, 2011).



**Figura 2:** Ciclos de transmissão do vírus dengue. (Adaptado de: Vasilakis, Cardoso, Hanley, Holmes & Weaver, 2011)

A passagem das estirpes selvagens do DENV para o ciclo de transmissão endêmico ocorreu independente e repetidamente em várias “zonas de emergência” isoladas antes da ocorrência dos fenómenos de urbanização, a partir da amplificação intermitente em diferentes espécies de primatas. De acordo com análises filogenéticas, à medida que se sucedeu o período de globalização durante a expansão comercial dos trópicos, os diferentes serotipos selvagens do vírus foram disseminados para novas regiões, o que culminou com a substituição vetorial de mosquitos primatófilos para peridomésticos e domésticos e com a exploração de novos recursos derivados das florestas tropicais, que permitiu um aumento do contacto entre as linhagens selvagens do vírus e a população humana (Chen & Vasilakis, 2011). Desta forma, as formas epidémicas/endémicas do vírus desenvolveram-se através de populações urbanas que providenciaram condições para a sustentabilidade da sua transmissão (Wang *et al.*, 2000).

De modo a verificar se as estirpes selvagens necessitam de um processo de adaptação para serem introduzidas no ciclo de transmissão epidémico, surgiram vários estudos. Vasilakis *et al.* (2007) constatou que a replicação da estirpe selvagem de DENV-2 em células dendríticas humanas era idêntica à infeção pela estirpe endêmica correspondente, concluindo que a capacidade infecciosa era idêntica ( $p=0,21$ ) (Vasilakis *et al.*, 2007). Outro estudo também realizado por Vasilakis *et al.* (2008) comparou infeções simultâneas provocadas por estirpes selvagens e endémicas de DENV-2 em culturas celulares de carcinoma hepático humanas (Huh-7), renais de primatas (Vero) e de *A. albopictus* (C6/36), onde constatou que nas células Huh-7 a carga viral máxima das estirpes endémicas era significativamente superior em relação à das estirpes selvagens ( $p=0,04$ ), ao contrário das células Vero e C6/36, cujas cargas virais eram semelhantes ( $p> 0,20$ ) (Vasilakis *et al.*, 2008). Assim, a emergência de linhagens selvagens é condicionada pela oportunidade em infetar diferentes hospedeiros e não pela sua adaptação, podendo emergir para o ciclo de transmissão endêmico (Mayer, Tesh, & Vasilakis, 2016).

Para demonstrar a divergência entre as estirpes selvagens e as endémicas, Wang *et al.* (2000) sequenciou o gene que codifica para a proteína do invólucro lipídico, tendo utilizado como amostras isolados de estirpes selvagens e endémicas de três serotipos do vírus dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-4) da Malásia e de estirpes selvagens de DENV-2 da África Ocidental. O último isolado foi previamente

analisado por Rico-Hesse (1990) usando outras regiões do genoma do vírus. Por análise filogenética, conclui-se que os isolados das linhagens selvagens asiáticas e africanas eram geneticamente díspares em relação aos isolados das linhagens epidêmicas. Tal como determinado por Rico-Hesse (1990), as estirpes selvagens do DENV-2 diferem em 19% nas sequências nucleotídicas quando comparadas com estirpes endêmicas. Os isolados de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 derivados da linhagem indígena asiática também demonstraram ser diferentes em relação aos respectivos isolados endêmicos e aos isolados selvagens africanos. As estirpes selvagens de DENV-2 da Malásia divergem das linhagens epidêmicas em 17% nas sequências nucleotídicas, enquanto os isolados de DENV-1 e DENV-4 diferenciam em 7% e 14%, respetivamente. Apesar de o serotipo 3 não ter sido isolado durante o estudo, foram detetados anticorpos em amostras serológicas de hospedeiros primatas da Malásia, sendo um indício de que possa existir um ciclo selvagem de DENV-3 (Rico-Hesse, 1990; Wang *et al.*, 2000).

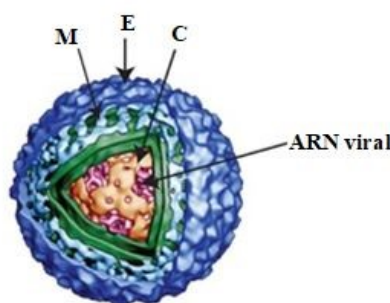
Relativamente ao quinto serotipo do DENV, o diagnóstico inicial no agricultor indicava que a infeção tinha sido provocada por uma estirpe selvagem de DENV-4. Contudo, verificou-se que era filogeneticamente diferente das três estirpes selvagens de DENV-4 conhecidas e que partilhava algumas semelhanças com DENV-2. Ao inocular a amostra em estudo em hospedeiros primatas que tinham sido previamente infetados com os quatro serotipos, constatou-se que os anticorpos produzidos eram significativamente distintos, concluindo que a amostra em estudo continha um novo serotipo e não uma variante do serotipo 4. A sua origem pode ser justificada pelo facto de o genoma do vírus ser susceptível a mutações, com o acréscimo da eventualidade de recombinações intramoleculares e consequente diferenciação das proteínas do invólucro. Hoje em dia sabe-se que o DENV-5 é transmitido ao nível do ciclo selvagem e das “zonas de emergência” e que segundo análises filogenéticas, o DENV-5 é geneticamente análogo aos outros serotipos, indicando que todos os serotipos evoluíram a partir de ancestrais comuns (Mustafa *et al.*, 2015).

Desta forma, a maior variedade de estirpes primitivas selvagens na Malásia em relação às de África indica que o antepassado de todos os serotipos do DENV emergiu na região asiática, evoluindo ao longo do tempo para os cinco serotipos atualmente descritos (Mustafa *et al.*, 2015; Weaver & Vasilakis, 2009).

### 3.3 Estrutura e genoma

O vírus encontra-se delimitado numa estrutura esférica com um diâmetro entre 40 a 50 nm, sendo formado por uma nucleocápside disposta num arranjo icosaédrico e envolvida externamente por um invólucro lipídico (Guzman *et al.*, 2010). Dentro da nucleocápside reside o genoma do vírus, que consiste numa molécula de ARN de cadeia simples e polaridade positiva com 11000 pb de comprimento, uma estrutura 5'-*cap* e não apresenta cauda poli-A na extremidade 3' (Esteves & Parreira, 2014).

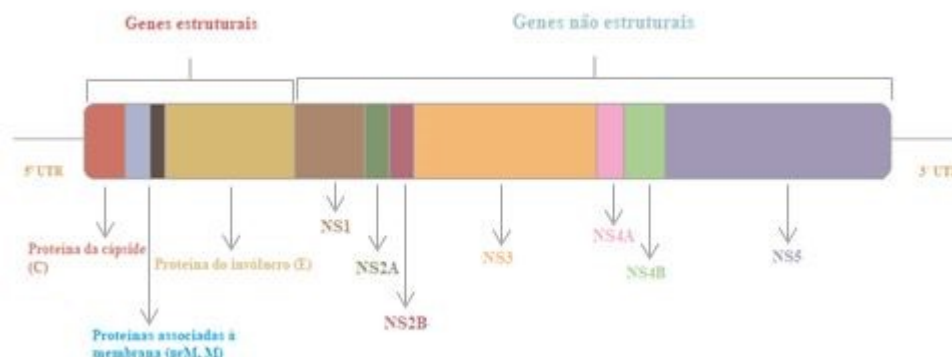
Contém uma única fase de leitura aberta, *open reading frame*, (ORF), que é traduzida num polipéptido-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5- que vai ser subsequentemente clivado por proteases celulares e serinas virais em três proteínas estruturais- proteína da cápside (C), proteína precursora da membrana (prM), que é posteriormente clivada por proteases celulares na proteína da membrana (M), e proteína do invólucro lipídico (E) - e sete proteínas não estruturais- NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Esteves & Parreira, 2014; Klema, Padmanabhan, & Choi, 2015). A Figura 3 representa esquematicamente a constituição de uma partícula do vírus dengue, apresentando as proteínas estruturais (M, E, C) e a molécula de ARN genómico.



**Figura 3:** Estrutura de uma partícula do vírus dengue. A proteína do invólucro lipídico (E) encontra-se representada a azul-escuro; a proteína da membrana (M) a azul-claro e a proteína da cápside (C) a cor de laranja, que cobre o genoma de ARN (a vermelho). (Adaptado de: Angel & Valle, 2013)

A ORF encontra-se restringida por regiões não traduzidas nas porções terminais 5' e 3', que constituem estruturas secundárias necessárias para a iniciação da tradução e replicação do genoma viral. A extremidade 5' é essencial para a replicação viral e síntese proteica e é metilada, particularidade do DENV. A região não traduzida 3', para além da replicação viral, é responsável pelo tropismo vírus/célula hospedeira, virulência e patogenicidade do vírus (Faheem *et al.*, 2011). A Figura 4 ilustra um

esquema representativo do genoma do vírus dengue, apresentando as dez proteínas virais e as regiões não traduzidas das extremidades 5' e 3'.



**Figura 4:** Esquema representativo do genoma de ARN viral, constituído pelas proteínas estruturais (C, prM, M e E) - e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e pelas regiões não traduzidas nas extremidades 5' (5'UTR) e 3' (3'UTR). (Adaptado de: Idrees & Ashfaq, 2012)

Para além de codificar proteínas virais, o genoma contém estruturas de ARN que exercem funções fundamentais na regulação de vários processos do ciclo viral, que atuam como promotores, potenciadores e redutores na transcrição, tradução, replicação de ARN e encapsidação. São ainda responsáveis por modular a resposta antiviral do hospedeiro, estimulando-a ou reprimindo-a (Iglesias & Gamarnik, 2011).

### 3.4 Proteínas estruturais e não estruturais

No retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira ocorre a tradução da região ORF, processo pelo qual origina uma poliproteína de grandes dimensões, que por sua vez é clivada na porção N-terminal da cadeia, dando origem a várias proteínas maduras. A mesma porção codifica para as proteínas estruturais e não estruturais anteriormente referidas (Iglesias & Gamarnik, 2011). As proteínas estruturais -C, M, E-são glicoproteínas responsáveis pelas funções de revestimento do vírus e pela entrada na célula hospedeira, com posterior integração do ARN viral (Goodsell, 2008; Guzman *et al.*, 2010).

A glicoproteína estrutural da cápside é a primeira proteína do genoma viral a ser codificada, e consiste numa proteína com carga positiva, com afinidade tanto para membranas lipídicas como ácidos nucleicos e que forma homodímeros em solução. A sua estrutura monomérica consiste em quatro hélices- $\alpha$ ,  $\alpha_1$  a  $\alpha_4$ , constituídas por 100 resíduos de aminoácidos, dos quais 26 são básicos e 3 são ácidos. As duas interfaces concebidas a partir do antiparalelismo entre as hélices  $\alpha_2$  e  $\alpha_4$  de um monómero e as mesmas da cadeia polipeptídica limítrofe formam a superfície de contacto do homodímero, enquanto as primeiras três hélices de cada monómero,  $\alpha_1$  a  $\alpha_3$ , constituem o núcleo da glicoproteína da cápside.

A região  $\alpha_4$ - $\alpha_4'$  do homodímero, que é constituída por resíduos de aminoácidos com carga positiva, é responsável pela manutenção da estrutura da glicoproteína C e pela interação com o genoma viral, ao mesmo tempo que as regiões apolares  $\alpha_2$ - $\alpha_2'$  e  $\alpha_1$ - $\alpha_1'$  contribuem para a interação com a membrana do retículo endoplasmático. Para além disto, a porção N-terminal da glicoproteína C, que possui na sua constituição 8 resíduos de Lisina ou Arginina, conferindo-lhe um carácter hidrófobo, também auxilia na encapsidação do ARN genómico.

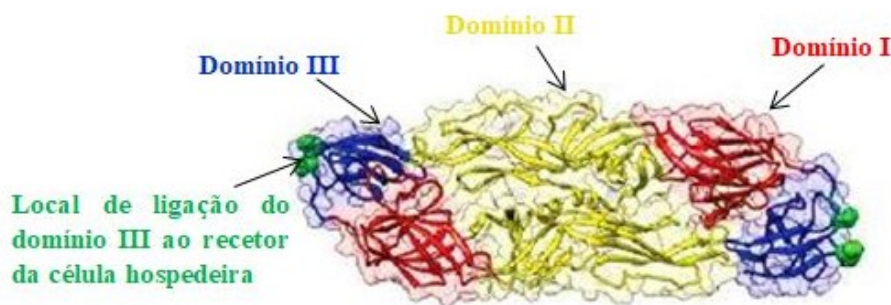
As cópias da glicoproteína C formam uma cápside à volta do genoma viral, que constitui a nucleocápside viral, conferindo, desta forma, a estrutura esférica do DENV. A nucleocápside, por sua vez, está envolvida por uma membrana lipídica e 180 cópias da glicoproteína E, ligadas à superfície da membrana a partir de um segmento transmembranar (Byk & Gamarnik, 2016; Goodsell, 2008).

O vírus, na sua forma imatura, possui uma proteína designada prM, que é um precursor da glicoproteína M. A prM possui heterodímeros prM-E, que ao estarem expostos ao pH ácido existente no *trans*-Golgi da célula hospedeira, alteram a sua conformação, permitindo que a protease do tipo furina clive a proteína prM glicosilada no péptido pr e na glicoproteína M. O péptido pr mantém-se ligado à glicoproteína E até à exocitose da partícula viral madura, de forma a prevenir a fusão do DENV no *trans*-Golgi. A glicoproteína M, constituída por sete folhas- $\beta$  antiparalelas estabilizadas por pontes dissulfito, juntamente com a glicoproteína do invólucro (E), constituem o invólucro viral e atuam na formação das partículas virais do DENV (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015; Dwivedi *et al.*, 2017). O invólucro lipídico é fundamental

para a proteção do genoma viral, na medida em que a estrutura da nucleocápside, de espessura fina, é permeável a ribonucleases. Ao mesmo tempo, o carácter protetor do invólucro permite que haja interação com a membrana da célula hospedeira aquando da fusão viral (Henchal & Putnak, 1990).

A glicoproteína E consiste num homotrímérico à superfície dos viriões maduros, e encontra-se nas partículas virais imaturas sob forma de heterodímeros prM-E (Henchal & Putnak, 1990).

Cada monómero da glicoproteína é constituído por três folhas- $\beta$  com três domínios distintos. O domínio I, localizado centralmente, possui uma função estrutural, ao passo que o domínio II intermedia a ligação entre o domínio estrutural I e o domínio III, responsável pela ligação aos recetores celulares. O domínio II possui ainda uma região de dimerização e um péptido de fusão hidrofóbico na extremidade distal. O domínio III consiste numa folha- $\beta$  de grandes dimensões exposta na superfície do vírus, que comporta o local de ligação ao recetor da célula alvo (Bäck & Lundkvist, 2013; Clyde, Kyle, & Harris, 2006; Cruz-Oliveira *et al.*, 2015; Dwivedi *et al.*, 2017; Faheem *et al.*, 2011). A Figura 5 ilustra a forma homodimérica da glicoproteína E, indicando a localização de cada domínio e do local de ligação à célula hospedeira.



**Figura 5:** Homodímero da glicoproteína E. O domínio I encontra-se retratado a vermelho; o domínio II a amarelo; o domínio III a azul e o respetivo local de ligação ao recetor da célula hospedeira a verde. (Adaptada de: Diamond & Pierson, 2015)

Esta glicoproteína é responsável por características fundamentais do DENV, nomeadamente a ligação ao recetor membranal, hemaglutinação de eritrócitos e da indução de anticorpos e da resposta imunitária (Guzman *et al.*, 2010). Dado que a glicoproteína E contém os epítomos principais do vírus dengue, é contra ela que se vão



produzir os anticorpos anti-DENV. De salientar que a glicosilação do invólucro varia nos diferentes serotipos virais. Consequentemente, os anticorpos antiglicoproteína E gerados por resposta imunológica serão distintos consoante os serotipos.

Ainda assim, a promoção da ligação entre o vírus e a célula hospedeira via recetores celulares, como o recetor não integrino captador da molécula de adesão intercelular 3 específica das células dendríticas (DC-SIGN), constitui a principal função desta glicoproteína (Clyde *et al.*, 2006; Faheem *et al.*, 2011).

As proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, são expressas na célula hospedeira e atuam ao nível de mecanismos de evasão da resposta imunitária do hospedeiro e de replicação do ARN viral, auxiliando na formação de novos vírus em associação com as proteínas da célula alvo (Sahili & Lescar, 2017).

A primeira proteína não estrutural, NS1, é uma glicoproteína que subsiste em três formas diferentes na célula hospedeira- monómero, dímero e hexâmero. Esta glicoproteína é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso sob forma de monómero hidrofílico. Posteriormente, a NS1 é encaminhada para o lúmen do retículo endoplasmático via péptido sinal existente na porção C-terminal da proteína E, onde por N-glicosilação a forma monomérica da NS1 é convertida num dímero, sendo este mais hidrofóbico do que a estrutura precedente. Durante o processo de dimerização, devido à hidrofobicidade adquirida, o dímero adquire afinidade para com as cisternas do retículo endoplasmático rugoso, ricas em lípidos.

O dímero de NS1, em conjunto com outras proteínas não estruturais, constitui o complexo de replicação viral, ao mesmo tempo que é secretado para a membrana plasmática, podendo ainda fundir-se com o *trans*-Golgi, originando a forma hexamérica, que se encontra no espaço extracelular da célula hospedeira. Para além da replicação viral, o dímero também participa na ativação do sistema do complemento e dos receptores *Toll* na superfície da célula alvo e nos endossomas formados aquando da internalização dos viriões. O hexâmero de NS1 partilha as duas últimas funções descritas para o dímero, bem como está associado a alterações da homeostasia do sistema de coagulação humano, na medida em que a reação cruzada sucedida entre os anticorpos anti-NS1 e componentes da matriz extracelular de células epiteliais dos

vasos sanguíneos (fibronectina, por exemplo), fatores de coagulação e trombócitos resulta num quadro clínico de febre hemorrágica (Rastogi, Sharma, & Singh, 2016).

A região codificante NS2 é traduzida em duas proteínas distintas, NS2A e NS2B. A proteína NS2A é uma proteína hidrofóbica com cinco domínios transmembranares que cobrem a bicamada lipídica da membrana do retículo endoplasmático. Tal como a glicoproteína NS1, também pertence ao complexo de replicação viral, sendo fundamental na replicação de ARN. Ao mesmo tempo, é um antagonista do interferão por inibir o seu sistema de sinalização. A NS2B atua como cofator para a protease de serina NS2B-NS3, que é responsável pela regulação da síntese do polipéptido (Dwivedi *et al.*, 2017; Faheem *et al.*, 2011).

A NS3 é uma enzima multifuncional que está envolvida na replicação do genoma viral, sendo constituída por um domínio na porção N-terminal que lhe permite a atividade de protease de serina no complexo NS2B-NS3 e outro na porção C-terminal com atividade de trifosfatase de nucleósidos (NTPase), de helicase e de ARN trifosfatase. As funções de NTPase, de helicase e ARN trifosfatase promovem a replicação de ARN viral, enquanto a protease de serina intervém na clivagem do polipéptido, e, por consequência na replicação viral (De Oliveira *et al.*, 2014; Dwivedi *et al.*, 2017).

A NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas que atuam na replicação viral e em interações entre o DENV e a célula hospedeira, ligadas através de um péptido (2K). A NS4A forma um componente que promove a formação do complexo de replicação viral. A porção C-terminal desta proteína atua como sequência sinalizadora para a translocação da proteína NS4B para o lúmen do retículo endoplasmático. Ou seja, a separação da ligação entre a NS4A e o péptido 2K efetuada pela protease de serina NS2B-NS3 permite que a sinalase celular desvincule a junção entre a NS4B e o péptido 2K. A NS4B tem como função mediar a replicação viral através da dissociação da helicase da proteína NS3 da cadeia simples de ARN do vírus. As proteínas NS4A e NS4B, juntamente com a NS2A, obstruem o sinal de transdução do interferão. A NS4B é um inibidor específico dos interferões gama e beta (Clyde *et al.*, 2006; Dwivedi *et al.*, 2017; Faheem *et al.*, 2011).

De todas as proteínas não estruturais, a NS5 é a que apresenta maiores dimensões e menor variabilidade na sequência de aminoácidos, partilhando aproximadamente 70% entre os serotipos 1 a 4. É composta por um domínio de metiltransferase (MTPase) localizado na região N-terminal e uma polimerase de ARN dependente de ARN (RdRp) na porção C-terminal. O domínio de MTPase está envolvido na síntese de ARN através da metilação da estrutura 5'-*cap* do genoma viral, prevenindo, desta forma, a sua degradação na célula hospedeira ao mesmo tempo que estimula a interação do ARN viral com os ribossomas aquando da tradução. Já a porção C-terminal com atividade RdRp liga-se especificamente ao genoma viral através da interação com um elemento promotor *stem-loop A* (SLA), localizado na extremidade 5', sendo que é a partir desta etapa que se inicia a síntese de ARN.

Esta proteína também se encontra presente no complexo de replicação viral e apresenta sinergia com a NS3, na medida em que estimula a atividade enzimática da ARN trifosfatase, permitindo que ocorra a desfosforilação da extremidade 5' não traduzida do ARN viral, antes da formação da estrutura *cap*; da NTPase e da helicase, dado que o desdobramento da forma cíclica do ARN permite a utilização da cadeia simples resultante como substrato da NS5. Outra função da proteína NS5 consiste na intervenção na resposta antiviral celular, visto que a ligação à molécula transdutora de sinal e ativadora de transcrição (STAT2) permite a degradação da mesma (Benarroch *et al.*, 2004; Sahili & Lescar, 2017).

### 3.5 Entrada e replicação viral na célula hospedeira

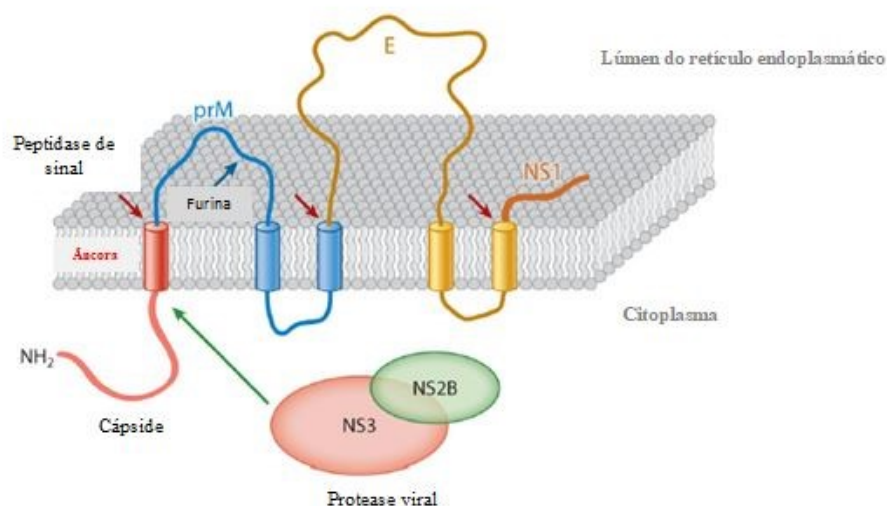
O ciclo de replicação do vírus dengue no hospedeiro humano inicia-se com a inoculação de partículas virais na corrente sanguínea por picada dos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, a partir da qual o vírus é introduzido em células localizadas na epiderme e na derme, por endocitose mediada por clatrina via glicoproteína de superfície viral e recetores de superfície celular em células dendríticas, especialmente células de Langerhans imaturas (Byk & Gamarnik, 2016; Martina, Koraka, & Osterhaus, 2009).

O DENV subsiste em várias formas dependendo do grau de clivagem da proteína prM. Apenas as partículas virais parcialmente e completamente maduras, isto é, com clivagem incompleta ou total da prM, respectivamente, é que são consideradas patogênicas para o Homem (Screaton, Mongkolsapaya, Yacoub, & Roberts, 2015).

A primeira etapa da infecção é a ligação ao recetor celular DC-SIGN, que é mediada pela glicoproteína E que permite a penetração na célula alvo por endocitose (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

Após ligação ao recetor da célula e internalização dos viriões por endocitose, o pH ácido do endossoma induz uma alteração conformacional irreversível trimérica em forma de “espigão” na glicoproteína E, onde os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos localizados no vértice do “espigão” provocam a fusão entre a membrana do vírus e o endossoma. Consequentemente, ocorre a libertação do ARN viral para o citoplasma da célula e iniciam-se as fases de tradução e replicação do genoma (Byk & Gamarnik, 2016; Goodsell, 2008).

O ARN do vírus dengue de cadeia positiva é então traduzido no retículo endoplasmático rugoso num polipéptido, onde os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das porções C-terminal das proteínas C, prM e E são usados como sequências de sinal que permitem a inserção do polipéptido restante na membrana do retículo endoplasmático. As sinalases celulares do retículo endoplasmático ao processar o polipéptido vão formar as proteínas transmembranares prM e E, que se associam num heterodímero, e a proteína NS1. A NS3 sofre autoproteólise, que juntamente com o cofactor NS2B processa as restantes proteínas não estruturais e a glicoproteína C (Figura 6) (Bäck & Lundkvist, 2013; Byk & Gamarnik, 2016).



**Figura 6:** Organização das proteínas estruturais e da proteína não estrutural NS1 na membrana do retículo endoplasmático. Os cilindros representam as hélices transmembranais e as setas a vermelho demonstram os locais de clivagem pós tradução por sinalases celulares. O local de ação da protease NS2B-NS3 está indicado com uma seta verde e o da protease de furina com uma seta azul. (Adaptada de: Byk & Gamarnik, 2016)

A infecção na célula hospedeira estimula a hipertrofia da membrana do retículo endoplasmático, formando vesículas onde se acumulam todos os intervenientes na replicação do ARN viral, que compreende as proteínas não estruturais, ARN do vírus e proteases celulares (Bäck & Lundkvist, 2013; Klema *et al.*, 2015).

Apesar do genoma do vírus apresentar uma estrutura linear, a sua forma replicativa demonstra uma conformação cíclica, que é composta por estruturas secundárias e terciárias que se alteram consoante o meio envolvente da célula alvo. A dinâmica da estrutura da molécula de ARN é então mediada por interações ARN-ARN de longo e curto alcance, sequências de nucleótidos e pela ligação da glicoproteína E aos recetores celulares (Canard, 2011; Iglesias & Gamarnik, 2011). As interações ARN-ARN e a ciclização do genoma são por sua vez moduladas pela existência de sequências complementares nas extremidades 5' e 3', que é composta por dez nucleótidos confinantes. Para que ocorra a ciclização de ARN e estabilização das interações ARN-ARN é preciso que haja afinidade e complementaridade de pelo menos dois pares de sequências de nucleótidos, uma vez que num estudo se constatou que ao deletar especificamente nucleótidos na extremidade 3' da molécula de ARN a ciclização não ocorreria, comprometendo a sua replicação (Alvarez *et al.*, 2005).

A forma cíclica do ARN liga-se ao complexo de replicação viral, dando início a uma primeira fase de síntese de novas moléculas de ARN.

A RdRp da proteína NS5 liga-se à região promotora SLA do ARN do vírus na extremidade 5' e inicia-se a formação da cadeia complementar de polaridade negativa no sentido 3'-5'. Esta cadeia fica emparelhada com a cadeia de polaridade positiva, constituindo a forma replicativa do ARN, de dupla cadeia (dsRNA). O fenómeno do emparelhamento deve-se ao facto da existência de um segundo domínio, *stem-loop B* (SLB), localizado também na mesma extremidade que a SLA, que possui uma sequência complementar a uma porção integrante da região não codificante da extremidade 3'. Esta sequência é então responsável pelas interações ARN-ARN a longo alcance e pela ciclização do ARN. A dsRNA é posteriormente clivada por ação da helicase da NS3, onde a cadeia de polaridade negativa é usada como modelo para a síntese de novas moléculas de ARN através da RdRp da proteína NS5. A dsRNA, por sua vez, é reutilizada para repetição do processo. A nova molécula de polaridade positiva é desfosforilada pela ARN trifosfatase da NS3 e metilada pela MTPase da NS5 para formar a estrutura 5'-cap (Iglesias & Gamarnik, 2011; Klema *et al.*, 2015).

Ciclos sucessivos de tradução sintetizam várias cópias das proteínas estruturais e não estruturais, as quais juntamente com as novas moléculas de ARN viral irão participar na produção, desenvolvimento e secreção das partículas virais. A montagem dos vírus sucede-se nas membranas do retículo endoplasmático, onde as proteínas da cápside e o ARN viral são circundados por segmentos da membrana do retículo que contêm a prM e E, sob a forma de heterodímeros prM-E, para formar partículas virais imaturas. Estas são transportadas via secretória até ao *trans*-Golgi, onde ocorre o desenvolvimento dos vírus por acção da protease do tipo furina. Dependendo do grau de transformação, o DENV subsiste sob a forma de partículas virais imaturas, parcialmente maduras ou totalmente maduras. No caso das duas últimas formas, o péptido pr mantém-se associado até o vírus ser libertado incompleta ou completamente, respetivamente, para o espaço extracelular (Screaton *et al.*, 2015).

Para além do recetor DC-SIGN, existem outros recetores celulares que permitem a entrada do vírus na célula hospedeira, como os glicosaminoglicanos de sulfato de heparina, o recetor da manose existente nos macrófagos, a molécula lectina tipo C

(CLEC5A) e o recetor da porção constante das imunoglobulinas (Fc $\gamma$ ) expresso em células fagocitárias mononucleares (Bäck & Lundkvist, 2013; Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). A Figura 7 ilustra o ciclo de replicação do DENV, que destaca as várias etapas deste processo, ordenando-as.

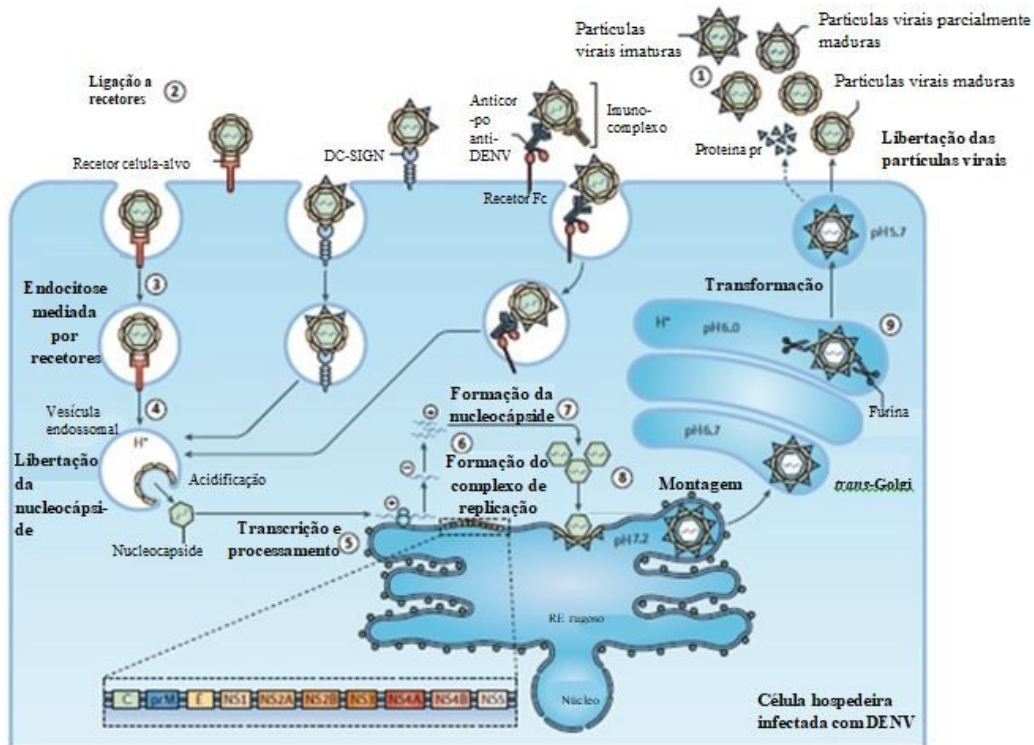


Figura 7: Ciclo de replicação do DENV. (Adaptada de: Screaton *et al.*, 2015)

#### 4. TRANSMISSÃO DO DENV

O DENV é transmitido por picada de mosquitos fêmea do género *Aedes*, sendo as espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* as mais eficazes na transmissão da infeção (CDC, 2012a, 2012b). Estas espécies têm um ciclo de vida adaptável tanto a ambientes urbanos como rurais, podendo alimentar-se a qualquer hora, especialmente durante o dia (Guzman & Istúriz, 2010; Higa, 2011).

Para além da adaptabilidade destas espécies, fatores como a falta de ordenamento do território em países subdesenvolvidos, isto é, escassez de condições básicas sanitárias, elevada densidade populacional e desorganização da ocupação do mesmo, associados ao aquecimento global, viagens internacionais, precariedade e insuficiência de meios de combate à disseminação do vetor, potenciam a propagação do mesmo, e, por consequência influenciam os padrões de incidência e proliferação do DENV (Guzman & Istúriz, 2010; Higa, 2011; Xavier *et al.*, 2017).

De forma a poder interpretar a competência destas espécies, é necessário conhecer o tempo de vida, a sua posição na cadeia alimentar (fatores bióticos), os habitats propícios ao desenvolvimento, reprodução e sobrevivência e condições eco ambientais dos mosquitos -temperatura, humidade, precipitação e outras características físico-químicas, nomeadamente a existência de inseticidas (fatores abióticos) (Sowilem, Kamal, & Khater, 2013).

Das espécies transmissoras dos cinco serotipos do DENV, a mais importante é *A. aegypti*, que reside tanto em áreas rurais, domésticas e peridomésticas, co habitando com o Homem (Díaz-Nieto *et al.*, 2016; Rey, 2014). Este artrópode é antropofílico, endofágico e endofílico, isto é, adquire sangue por picada no hospedeiro (por norma, o Homem), preferindo o interior de habitações para digestão da refeição e reprodução, uma vez que se encontra menos sujeito a variações de temperatura, prolongando, desta forma, a sua longevidade (Scott & Morrison, 2010; WHO, s.d.b). Ao contrário de *A. aegypti*, *A. albopictus* é considerado um artrópode oportunista, dado que tem uma gama variada de hospedeiros vertebrados, que inclui animais de sangue frio, como répteis e anfíbios, e de sangue quente, como aves, cães, cabras, vitelas e o Homem (Dieng *et al.*, 2012; Scholte & Schaffner, 2007).

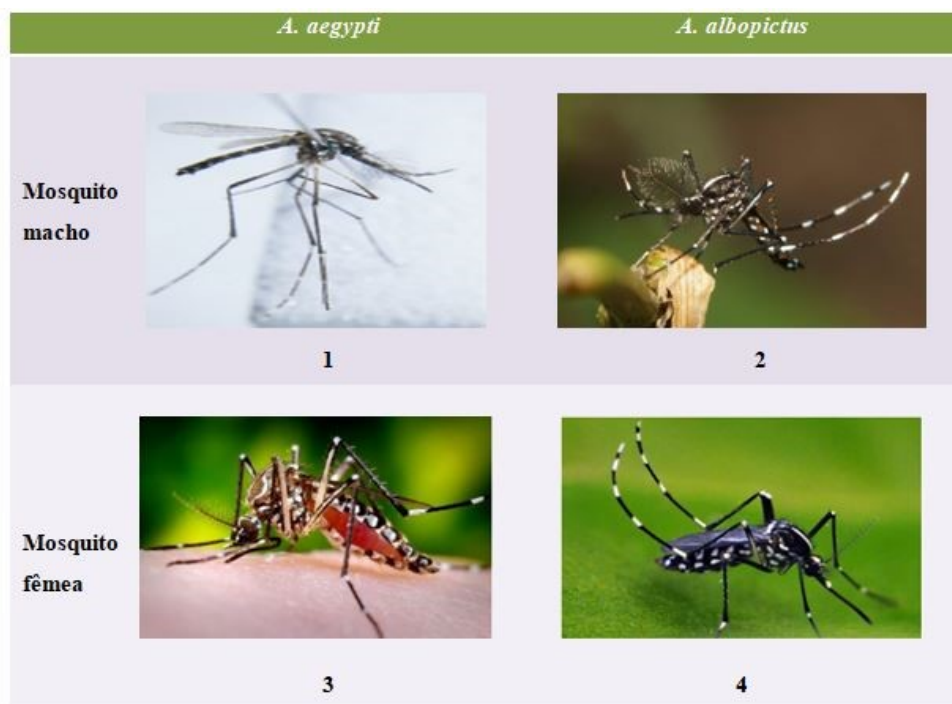


Tanto as fêmeas de *A. aegypti* como de *A. albopictus* preferem o sangue humano como fonte de nutrição, pois permite estimular o desenvolvimento ovário e o crescimento do mosquito fêmea, e, por consequência, prolonga a longevidade, melhora a fertilidade e a sua competência como vetores (Paupy, Delatte, Bagny, Corbel, & Fontenille, 2009; Sowilem *et al.*, 2013).

Em termos anatómicos, os mosquitos *A. aegypti* adultos medem aproximadamente 4 a 7 mm e os mosquitos *A. albopictus* 2 a 10 mm, sendo considerados artrópodes de médio porte (Rios & Maruniak, 2014; Zettel & Kaufman, 2016). No mosquito *A. aegypti*, a superfície dorsal do tórax contém escamas esbranquiçadas, cuja disposição se assemelha à forma de um violino ou de uma lira, ao passo que o abdômen apresenta uma tonalidade mais escura, situada entre o castanho e o preto, podendo, todavia, conter o mesmo tipo de escamas. As patas traseiras são caracterizadas por exibirem uma coloração escura com manchas semelhantes a riscas brancas (Clemons *et al.*, 2010; Zettel & Kaufman, 2016).

Os mosquitos *A. albopictus* são reconhecidos através das escamas em negrito, brilhantes e em prateado nos palpos maxilares e nas patas. O *scutum* é preto e contém uma risca branca desde a superfície dorsal da cabeça, percorrendo o tórax. A parte dorsal do abdômen encontra-se coberta de escamas escuras com manchas brancas e as pernas são pretas com escamas brancas em cada segmento tarsal. Todos os mosquitos do gênero *Aedes* têm um abdômen com forma pontiaguda (Rios & Maruniak, 2014).

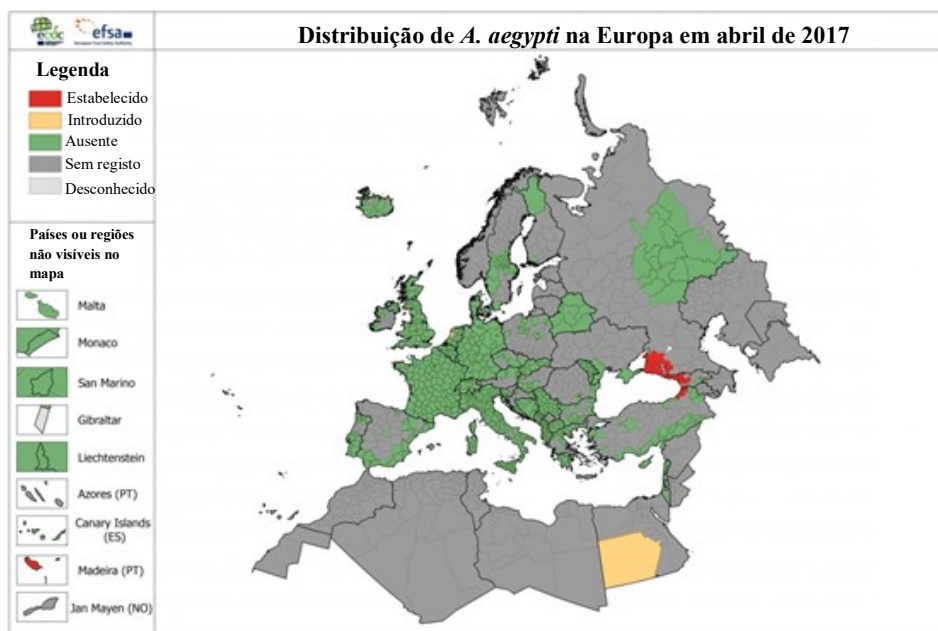
Os mosquitos fêmea de ambas as espécies são de maior porte do que os machos, e podem distinguir-se pela existência de antenas pouco pilosas e por estarem adaptadas à alimentação por sangue de vertebrados devido à existência de “abas” bucais sugadoras, ao contrário dos machos, que possuem antenas plumosas e apenas se alimentam do néctar de plantas. No entanto, as fêmeas de ambas as espécies também conseguem utilizar o néctar de plantas como fonte de alimento (Hartman, 2011; Zettel & Kaufman, 2016). A Figura 8 representa nos quadrantes 1 e 3 a aparência de um mosquito macho e de um mosquito fêmea, respetivamente, da espécie *A. aegypti*, e nos quadrantes 2 e 4 uma ilustração de um mosquito macho e de um mosquito fêmea, respetivamente, da espécie *A. albopictus*.



**Figura 8:** Principais mosquitos transmissores do DENV (*A. aegypti* e *A. albopictus*). Destaca-se as antenas plumosas dos mosquitos macho (1 e 2), as antenas pilosas dos mosquitos fêmea (3 e 4), as escamas esbranquiçadas na superfície dorsal e as listas pretas nas pernas de *A. aegypti* (1 e 3) e a risca branca da superfície dorsal da cabeça característica de *A. albopictus* (2 e 4). (Adaptado de: CDC, 2006; Dallimore *et al.*, 2017; Entomology Today, 2017; Iowa State University, 2017)

Como suplemento das características anatômicas das fêmeas de mosquito, as glândulas salivares destes artrópodes sintetizam proteínas com propriedades vasodilatadoras, inibidoras da cascata de coagulação, antiagregantes plaquetárias, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. A primeira faculdade é crucial tanto para a subsistência do vetor como do agente patogénico, na medida em que atua como adjuvante na alimentação, através do aumento do fluxo de sangue, ao mesmo tempo que facilita a transmissão do DENV. Os inibidores da cascata de coagulação e de agregação plaquetária regulam o fluxo de sangue nas “abas” bucais sugadoras e impedem a cicatrização do local da picada, enquanto as proteínas anti-inflamatórias tornam a mordida imperceptível. Por último, os antígenos do mosquito são responsáveis pela produção de imunoglobulinas E e G (IgG) nos indivíduos alérgicos aos constituintes salivares do artrópode (De Carvalho, Rocha, & Almeida, 2011; Dhar & Kumar, 2003; Doucoure & Drame, 2015).

Relativamente à distribuição dos vetores, *A. aegypti* é provavelmente oriundo do Oeste de África, tendo-se difundindo ao longo de regiões tropicais, subtropicais e de temperaturas amenas. Em termos históricos, tem sido reportada a existência deste artrópode em todos os países mediterrânicos, bem como na região do Cáucaso (sul da Rússia, Georgia e Azerbaijão), Portugal Continental e nos arquipélagos das Canárias e nos Açores (Schaffner & Mathis, 2014). Atualmente encontra-se distribuído no Continente Africano, Sudoeste dos Estados Unidos da América, Médio Oriente, Sudoeste Asiático, Ilhas do Pacífico e do Índico e no Norte da Austrália (Soumahoro *et al.*, 2010). Na Europa, apesar de a sua extensão ser mais limitada, encontra-se estabelecido no arquipélago da Madeira e na região do Cáucaso e introduzido na Holanda (Figura 9) (European Center for Disease Prevention and Control, 2017).



**Figura 9:** Distribuição de *A. aegypti* na Europa. (Adaptado de: ECDC, 2017)

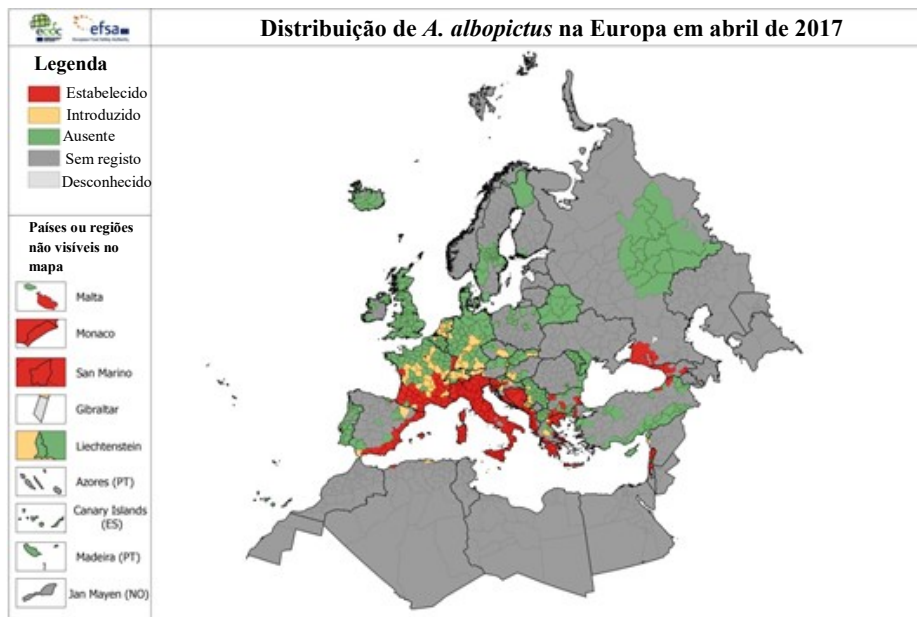
Em Portugal, o primeiro caso confirmado de *A. aegypti* ocorreu entre 2004 e 2005 em Santa Luzia, na Região Autónoma da Madeira (Almeida *et al.*, 2007). Acredita-se que a sua origem seria proveniente da região das Caraíbas, sendo introduzido no arquipélago a partir de viajantes infetados (Alves *et al.*, 2013). Apesar de terem sido tomadas medidas de controlo do vetor, nomeadamente a redução de locais de deposição de ovos, aplicação de inseticidas e educação populacional,

população de mosquitos pôde prosperar na região devido à existência de ovos em locais de difícil acesso (Almeida *et al.*, 2007).

Em Portugal Continental, o artrópode foi detetado pela primeira vez em 1956, sendo que até à data não existem registos do seu avistamento (Almeida *et al.*, 2007; ECDC, 2016). A inexistência destes mesmos registos pode ser justificada pelo facto de durante a campanha de luta contra a malária que decorreu na primeira metade do século XX, ter sido utilizado diclorodifeniltricloroetano, inseticida vulgarmente conhecido por DDT, contra o vetor *Anopheles atroparvus* (Alves, Zé-Zé, Amaro, & Osório, 2016).

Já a distribuição de *A. albopictus* é distinta, na medida em que esta espécie é proveniente das florestas tropicais do Sudeste Asiático, coincidente com a origem do DENV, e tem-se expandindo para outros continentes, incluindo África, Europa, América do Norte e do Sul e outras regiões dos Oceanos Pacífico e Índico. Na Europa, o primeiro registo de *A. albopictus* remota a 1979, na Albânia. Desde esta data, o mosquito tem-se difundindo por vários países, particularmente na Itália, Espanha, França, Malta, Mónaco, San Marino e Grécia, sendo introduzido, por exemplo, nalgumas regiões da Alemanha (Figura 10) (Chen & Vasilakis, 2011; ECDC, 2016b).

Em Portugal Continental, o artrópode foi detetado na Região Norte pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no âmbito da Rede Nacional de Vigilância de Vetores (REVIVE). Até à data, não foi comprovada a existência de agentes patogénicos para o Homem nos mosquitos (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2017).



**Figura 10:** Distribuição de *A. albopictus* na Europa. (Adaptado de: ECDC, 2017)

Em comparação com o mosquito *A. aegypti*, este artrópode tem sido detectado em mais regiões do hemisfério norte, dado que os seus ovos possuem a capacidade de se adaptar a temperaturas mais frias, estando em diapausa durante o inverno nas zonas com temperaturas amenas (regiões com as quatro estações do ano), nomeadamente na Europa. A adaptação pode ser justificada pelo facto de durante as fases de ovo e de larva, sintetizam uma quantidade de lípidos suficiente para suportar climas mais frios, sendo que na fase de larva, a lipogénese no *A. albopictus* é superior à no *A. aegypti* (Paupy *et al.*, 2009). Assim, *A. albopictus* apenas se torna no vetor principal do vírus dengue em regiões onde *A. aegypti* não é predominante. Nos países em que *A. aegypti* é o vetor dominante, *A. albopictus* comporta-se como um vetor de manutenção do DENV, principalmente nos ciclos rurais e selvagens, demonstrando também a existência de competição geográfica entre as duas espécies (Añez & Rios, 2013; Lambrechts, Scott, & Gubler, 2010).

Quanto ao habitat dos vetores, *A. aegypti*, antes da ocorrência dos fenómenos de globalização e de urbanização, habitava preferencialmente áreas florestais de carácter tropical, tendo como local de eleição cavidades formadas nas árvores preenchidas com água da chuva, uma vez que à superfície destes locais ocorre a deposição dos ovos do mosquito e posterior desenvolvimento até à forma adulta (Weaver & Reisen, 2010).

Ao adaptar-se a zonas urbanizadas, pôde utilizar reservatórios criados pelo Homem, particularmente vasos, tanques e baldes, localizados sobretudo perto de habitações. Contudo, a manutenção desta espécie encontra-se condicionada por diversos fatores meteorológicos, nomeadamente a temperatura, humidade, precipitação, luz solar e intensidade do vento. Sendo um artrópode tropical, climas com precipitação e humidade elevadas providenciam as condições ideais para a proliferação da espécie (Jansen & Beebe, 2010).

Remetendo para o caso da deteção deste artrópode no Arquipélago da Madeira, a preocupação relativamente à transmissão autóctone do DENV é constante, visto que o clima é favorável ao desenvolvimento da espécie. Devido à crescente imigração e acréscimo de viagens para regiões endémicas, juntamente com o transporte de vasos de plantas, à qual a Região Autónoma da Madeira é produtora, via aérea ou marítima, para Portugal Continental e outros países europeus, o risco de reintrodução desta espécie no território europeu é elevado (Almeida *et al.*, 2007; Domanovic *et al.*, 2012).

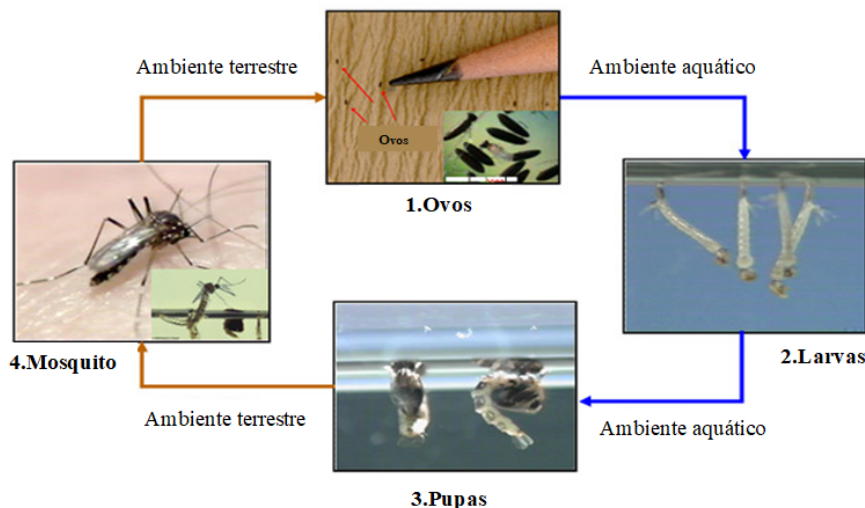
No caso de *A. albopictus*, devido à sua adaptabilidade inerente, consegue escolher o seu habitat consoante as fontes de alimento e locais de reprodução e desenvolvimento disponíveis. Não obstante a preferência deste mosquito por áreas rurais e suburbanas, subsiste tanto em ambientes naturais- cavidades de árvores, fendas de rochas e troncos de bambu- como em ambientes artificiais-pneus usados, sarjetas de esgotos e cisternas, por exemplo (Hartman, 2011; Paupy *et al.*, 2009).

Redirecionando para a deteção do mosquito em território português, devido às alterações climáticas registadas nas últimas décadas e à proximidade de países endémicos, Portugal é considerado um país de elevado risco para a disseminação deste vetor, com a consequente propagação de arboviroses, entre as quais o vírus dengue (Almeida *et al.*, 2008).

Em relação à reprodução e ciclo de vida dos vetores, o género *Aedes*, aquando do acasalamento, apresenta um comportamento flexível dado que consegue acasalar aos pares ou em agrupamentos. Ao encontrar o seu par compatível sucede-se a cópula, com a posterior inseminação na posição ventral. O ciclo de metamorfose de *A. aegypti*

e de *A. albopictus* é constituído por quatro fases, que consistem na fase de ovo, larva, pupa e adulto (Oliva, Damiens, & Benedict, 2014; Zettel & Kaufman, 2016).

Este ciclo tem a duração média de 8 a 10 dias à temperatura ambiente, dependendo da dieta do mosquito fêmea, e decorre tanto em ambiente aquático (larva e pupa) como ambiente terrestre (fase de ovo e adulta), demonstrado na Figura 11 (CDC, 2012c; Hartman, 2011).



**Figura 11:** Ciclo de vida de *A. aegypti* e de *A. albopictus*. Encontra-se representado a fase de ovo (1), larva (2), pupa (3) e fase adulta (4). As fases de ovo e adulta ocorrem em ambiente terrestre (1 e 4) e as larvas e pupas em ambiente aquático (2 e 3). (Adaptado de: CDC, 2012c)

Após uma refeição completa à base de sangue, inicia-se o ciclo gonotrófico, que é definido como o tempo que decorre desde a picada do mosquito até à postura dos ovos (Scott *et al.*, 2000). Num único ciclo gonotrófico, as fêmeas de *A. aegypti* podem ingerir duas a três refeições de sangue, enquanto as fêmeas de *A. albopictus* apenas necessitam de uma refeição de sangue para efetuar a postura dos ovos (Neto & Navarro-Silva, 2004; Scott *et al.*, 2000).

A capacidade reprodutiva nas fêmeas encontra-se correlacionada com a ingestão de sangue, sendo que quanto maior for a ingestão de sangue, maior será o número de ovos depositados, enquanto nos machos é aferida por competência sexual. Caso a copulação não seja devidamente efetuada, a manutenção das espécies encontrar-se-ia comprometida (Hartman, 2011; Sowilem *et al.*, 2013).

O número de ovos depositados pelas duas espécies é diferente, na medida em que as gerações de *A. aegypti* formadas são contínuas, isto é, o mosquito pode gerar um número indefinido de gerações por ano, depositando por cada ciclo de vida 100 a 200 ovos por cada postura, podendo fazer até 5 posturas, ao passo que *A. albopictus* gera 5-17 gerações por ano, depositando 45-200 ovos por ano (Alves *et al.*, 2016; Clemons *et al.*, 2010; ECDC, 2016b; Hartman, 2011).

Para além disto, a atividade de *A. albopictus* varia consoante a região em que se insere uma determinada população, sendo ativo durante todo o ano no caso de populações tropicais e subtropicais, à semelhança de *A. aegypti*, e com um período de diapausa no caso de populações residentes em regiões de temperatura amena (ECDC, 2016a, 2016b).

A postura dos ovos ocorre em reservatórios com água, sendo depositados à superfície destes. Normalmente não depositam todos os ovos num mesmo local, preferindo disseminá-los em duas ou mais zonas, promovendo a proliferação das espécies (Hartman, 2011; Zettel & Kaufman, 2016).

Os ovos de *A. aegypti* e de *A. albopictus* são bastante resistentes sobrevivendo por vários meses ou anos a fatores adversos como secas, sendo uma das razões que leva ao difícil controlo destas espécies. Contudo, *A. aegypti* não se encontra adaptado a regiões frias (Alves *et al.*, 2016; ECDC, 2016b).

Embora a ovogénese de *A. aegypti* e das populações tropicais e subtropicais de *A. albopictus* dependa de fatores idênticos, como a temperatura, que estimula o desenvolvimento dos embriões principalmente em climas quentes, a humidade, que promove a eclosão dos ovos e da alimentação do mosquito fêmea, nas populações de *A. albopictus* de regiões amenas, para além dos fatores anteriormente referidos e particularmente a temperatura, a fotoperiodicidade é um fator que condiciona o início da fase de diapausa, sendo que os ovos que estão em locais com menos horas de sol e temperaturas mais frias demoram mais tempo a iniciar a fase de larva (ECDC, 2016b; Sowilem *et al.*, 2013).

Assim que o nível de água dos reservatórios seja suficiente para a submersão dos ovos, inicia-se a fase larvar, que é constituída por quatro estágios com a duração de 4 dias no caso de *A. aegypti* e de 5-10 dias para *A. albopictus* (Clemons *et al.*, 2010) ;Rios & Maruniak, 2014). A nutrição das larvas consiste em algas e outros microrganismos encontrados na água. Após o quarto estágio inicia-se a fase de pupa.



Neste período as pupas dos mosquitos não se alimentam, atingindo a maturidade ao fim de 2 dias (Clemons *et al.*, 2010; Hartman, 2011).

O tempo médio de vida do mosquito adulto é de duas semanas a um mês para *A. aegypti* e 30 a 40 dias para *A. albopictus*. As fêmeas das duas espécies vivem mais tempo do que os mosquitos macho (Hartman, 2011; Zettel & Kaufman, 2016).

Posto isto, o tamanho do vetor, o tipo de dieta, a frequência e horário das refeições, a nutrição das larvas, as condições ambientais e a existência de predadores e de espécies competitivas interferem no ciclo de vida e na distribuição geográfica dos mosquitos (Hartman, 2011; Sowilem *et al.*, 2013).

A transmissão do DENV para os mosquitos ocorre aquando da picada de um indivíduo que se encontre em fase de virémia, que dura normalmente entre 4 a 5 dias. Após a ingestão de sangue do hospedeiro infetado, sucede-se um período de incubação extrínseco, onde o vírus localizado nas células epiteliais do intestino se desloca para as glândulas salivares do mosquito (Gubler, 1998; Guzman & Istúriz, 2010; Watts, Burke, Harrison, Whitmire, & Nisalak, 1987).

A passagem do vírus para as glândulas salivares do mosquito encontra-se dependente de fatores ambientais (temperatura e humidade, por exemplo) e intrínsecos (competência do vetor e genótipo do DENV), que podem atrasar ou acelerar este processo (Jupatanakul, Sim, & Dimopoulos, 2014).

A título de exemplo, surgiram vários estudos que demonstram que temperaturas elevadas aceleram a replicação e disseminação do DENV nos mosquitos. Quanto ao mosquito *A. aegypti*, de acordo com Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A (1987), constatou-se que o período de incubação extrínseco do DENV-2 no mosquito diminui de 12 dias a 30 °C para 7 dias a 32 °C e a 35 °C, enquanto no mosquito *A. albopictus*, segundo Xiao *et. al* (2014), o período de incubação extrínseco do DENV-2 no mosquito foi reduzido de 10 dias a 21 °C para 4 dias quando exposto a 31 °C e a 36 °C (Watts *et al.*, 1987; Xiao *et al.*, 2014). Relacionando este facto com o ciclo de vida dos artrópodes, a mesma condição climática permite ainda estimular a digestão de sangue e diminuir o tempo necessário para decorrer o ciclo gonotrófico, aumentando, desta forma, a infecciosidade dos vetores (Sowilem *et al.*, 2013).

A competência vetorial dos mosquitos na transmissão do DENV pode ser medida principalmente pela capacidade das células epiteliais do intestino em resistirem a infecções virais e pelo microbioma dos artrópodes. No caso de *A. aegypti*, devido à aquisição de bactérias do género *Proteus* nos intestinos via habitat, torna-se menos susceptível à infecção por vírus dengue do que *A. albopictus*. Isto significa que *A. albopictus* pode ser infetado com uma carga viral inferior ao ingerir sangue de um indivíduo virémico. Já nas glândulas salivares de *A. albopictus*, bactérias do género *Wolbachia*, adquiridas por transmissão vertical, providenciam ao artrópode resistência à infecção por vírus dengue, flora microbiana que é inexistente no mosquito *A. aegypti* (Iturbe-Ormaetxe, Walker, & O'Neill, 2011; Jupatanakul *et al.*, 2014; Mousson *et al.*, 2012).

À luz dos factos evidenciados, *A. aegypti* é um vetor mais eficaz do que *A. albopictus* por ter hábitos antropofílicos mais acentuados, por transmitir uma carga viral superior e por contrair infecções persistentes nas glândulas salivares, acrescido ao facto de por cada ciclo gonotrófico o mosquito poder-se alimentar várias vezes (Lambrechts *et al.*, 2010; Mousson *et al.*, 2012; Salazar, Richardson, Sánchez-Vargas, Olson, & Beaty, 2007).

## 5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE

A doença originada pelos cinco serotipos do DENV apresenta características ímpares pela existência tanto de infecções assintomáticas, que representam 75% dos casos, como sintomáticas, que podem ser leves a moderadas até mais severas e de por vezes o prognóstico da doença ser imprevisível (Dwivedi *et al.*, 2017; Pan American Health Organization, 2017; Sharp, Perez-Padilla, & Waterman, 2017).

Desde 1975 até 2009, a OMS classificava os casos clínicos de dengue como febre indiferenciada, FD ou FHD com possível evolução para SCD. Para o doente possuir FD teria que apresentar pelo menos dois sintomas, já incluindo as manifestações febris, e ter estado numa área endêmica. Os sintomas consistiam em náuseas, vômitos, cefaleias, artralgia, mialgia, dor retro orbital, erupções cutâneas, hemorragias e leucopénia. Por estas manifestações clínicas não serem específicas da doença, implicava a necessidade de se recorrer a testes laboratoriais para confirmação de DENV, o que por vezes era impossível. No caso da definição da FHD, eram consideradas quatro condições, que incluíam febre, hemorragias, trombocitopénia e extravasamento plasmático. Como se considerava que estes fatores eram confirmatórios de FHD, não era necessária a execução de provas laboratoriais. À medida que este modelo de classificação era empregue na prática clínica, sofreu várias críticas ao nível da sua complexidade, utilidade e aplicação (Simmons, Farrar, Vinh Chau, & Wills, 2012; Srikiatkachorn *et al.*, 2011).

Nos dias de hoje, a OMS qualifica a infeção por DENV em três categorias, que incluem caso provável, dengue com sinais de alerta e dengue grave, sendo acompanhadas por ensaios laboratoriais de diagnóstico e por critérios epidemiológicos (Pan American Health Organization, 2017; WHO, 2012b).

A primeira classificação é relativamente idêntica à FD, uma vez que também considera um quadro agudo de febre, os locais de estadia do doente e a exibição de pelo menos duas manifestações clínicas. Todavia, a nova classificação refere-se a dores generalizadas, não apenas artralgias e mialgias, e ao teste de torniquete positivo (20 ou mais petéquias no adulto e 10 ou mais em crianças no antebraço), que não estão incluídos na classificação tradicional de FD (WHO, 2012b). Os critérios epidemiológicos são definidos pela residência ou estadia numa região afetada 14 dias

antes do aparecimento dos sintomas (Pan American Health Organization, 2017; Sharp *et al.*, 2017).

Uma das principais distinções entre as duas classificações é a identificação de sinais de alerta. Na mais recente categorização, para além dos sinais, sintomas e outros critérios definidos na primeira qualificação, o doente apresenta dores abdominais intensas, hiperémese, efusão pericárdica, pleural, ascite, hepatomegália, hipotensão ortostática, hemorragia das mucosas, irritabilidade, aumento do hematócrito e decréscimo abrupto na contagem de plaquetas (Pan American Health Organization, 2017; Srikiatkachorn *et al.*, 2011; WHO, 2012b). Outra dissemelhança consiste no detalhe da descrição da forma mais severa de infeção por DENV, em comparação com a classificação tradicional. A dengue grave é representada por sinais e sintomas de comprometimento vascular, que normalmente resultam em choque hipovolémico e falha respiratória devido ao extravasamento plasmático, hemorragias severas e disfunção múltipla de órgãos. Esta falência de órgãos conduz ao incremento das transaminases, insuficiência cardíaca ou perda de consciência (Pan American Health Organization, 2017; Srikiatkachorn *et al.*, 2011). Desta forma, a melhor compreensão do mecanismo de manifestações clínicas como a SCD contribui para a redução da mortalidade aquando do período de defervescência, em parte devido à nova classificação atribuída pela OMS (Katzelnick *et al.*, 2017).

O início da infeção por DENV coincide na fase de virémia, que começa ligeiramente antes do aparecimento das manifestações clínicas (Faheem *et al.*, 2011). Imediatamente a seguir ao período de incubação de 3 a 10 dias sucedem-se três fases da infeção, que incluem a fase febril, fase aguda durante o período de defervescência e fase de recuperação (Sharp *et al.*, 2017).

A duração da fase inicial é de 2 a 7 dias e é caracterizada maioritariamente por manifestações febris acima dos 38,5 °C, de índole auto-limitada e que raramente evoluem para formas mais graves da doença. Como consequência da febre, a ocorrência de desidratação, distúrbios neurológicos e convulsões febris são comuns, principalmente em crianças. Para além dos sintomas coincidentes com a classificação inicial da infeção por DENV, outros indícios como anorexia, rubor facial, orofaringite e fotofobia também são comuns. Os resultados laboratoriais não só indicam leucopenia, como também trombocitopenia e um aumento ligeiro dos níveis de

aminotransferases hepáticas (Simmons *et al.*, 2012; WHO, 2012b). Em situações mais raras, podem surgir complicações como hemorragias gastrointestinais e vaginais em mulheres de idade fértil (WHO, 2012b).

Entre a fase febril e a fase aguda, o profissional de saúde deve monitorizar a evolução dos sinais e sintomas que evidenciem uma perda vascular acentuada (Pan American Health Organization, 2017; Simmons *et al.*, 2012). Ou seja, nesta etapa é importante verificar se o doente possui sintomas concordantes com a segunda classificação da infecção por DENV, de forma a controlar a progressão da doença (WHO, 2012b).

A fase aguda que geralmente tem a duração entre 24 a 48 horas, é caracterizada pelo decréscimo da temperatura corporal no mínimo para valores entre os 37,5 °C e os 38 °C. Frequentemente são descritas síndromes de extravasamento vascular sistémicas em alguns doentes, como crianças e adultos jovens, devido ao aumento da concentração de eritrócitos, hipoproteinémia, efusão pleural e ascite derivados do incremento da permeabilidade vascular (Simmons *et al.*, 2012; Sharp *et al.*, 2017; WHO, 2012b). Por sua vez, o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos deve-se à ativação das proteínas do complemento C3 e C5, bem como de outros fatores imunológicos, nomeadamente as interleucinas 6 e 8 e o interferão gama (Faheem *et al.*, 2011). Se o extravasamento e o aumento da permeabilidade vasculares forem incessantes, com a consequente redução do volume plasmático, a ocorrência de SCD torna-se iminente (Simmons *et al.*, 2012). Nas situações em que o choque é acentuado, o doente pode experienciar sintomas de hematémese, melenas e/ou menorragias e comprometimento de funções de vários órgãos em resultado da acidose metabólica devido à insuficiente perfusão tecidual, que se pode traduzir, por exemplo, em hepatite, miocardite e encefalite (Sharp *et al.*, 2017; WHO, 2012b). Assim, os doentes que evidenciem estes sinais e sintomas são classificados como tendo dengue grave (Pan American Health Organization, 2017).

Caso o doente sobreviva à fase aguda, sucede-se a fase de recuperação, onde se verifica um cansaço intenso resultante das várias fases da doença (Simmons *et al.*, 2012). Nesta etapa ocorre uma reabsorção gradual do fluido pleural, abdominal e intravascular extravasado, ao mesmo tempo que a hemóstase é estabilizada (Sharp *et al.*, 2017).

Assim, a variabilidade de sinais e sintomas pode ser explicada pelo tropismo que o DENV apresenta por diferentes tecidos. Ou seja, devido ao processo de infecção, as células de Langerhans infectadas sofrem maturação e migram dos tecidos periféricos para os gânglios linfáticos, onde os macrófagos e os monócitos são posteriormente infectados pelo DENV (Martina *et al.*, 2009).

Por conseguinte, a infecção é disseminada por todo o sistema linfático. A proliferação do vírus estende-se também a outros tecidos, como o fígado, o baço, o timo, pulmão, rim, sangue e medula óssea (Martina *et al.*, 2009).

No fígado as células do parênquima hepático, incluindo as células de *Kupffer* e as células endoteliais sinusoidais, são as mais atingidas. No baço, as células linfóides e macrófagos exibem antígenos virais. No pulmão, as células endoteliais e os macrófagos dos alvéolos pulmonares são as células mais afetadas. No rim, os túbulos renais são a estrutura principalmente afetada. A detecção de antígenos virais no interior destas células, e maioritariamente em células fagocitárias mononucleares, não significa que foram utilizadas para replicação viral. Isto é, os antígenos virais podem derivar de vírus fagocitados ou ainda de imunocomplexos que são captados aquando do processo de degradação. O vírus dissemina-se também para outros tecidos como o da tiróide, pâncreas, coração, músculo esquelético, glândula suprarrenal e cérebro, mas em menor extensão (Jessie, Fong, Devi, Lam, & Wong, 2004).

Durante uma infecção primária, a maioria dos indivíduos apresenta um quadro clínico idêntico à fase febril. Já nas infecções secundárias, a tendência fisiopatológica a complicações mais graves é eminente, sobretudo se forem instigadas por um serotipo heterólogo do vírus (Faheem *et al.*, 2011). Contudo, a fisionomia mais severa da doença também pode ocorrer em infecções primárias, cuja condição é dependente do serotipo do DENV (Clyde *et al.*, 2006).

Não só os fatores referidos anteriormente são determinantes para o desenvolvimento de dengue grave, como também o genótipo do serotipo, a idade e sexo do hospedeiro, existência ou não de patologias que possam exacerbar os sintomas deste estado, resposta imunitária do indivíduo em causa e ainda a predisposição

genética na susceptibilidade ou resistência ao vírus (Clyde *et al.*, 2006; Guzman *et al.*, 2010; Simmons *et al.*, 2012).

Os genótipos dos vários serotipos do vírus influenciam a gravidade de infecção na medida em que, por exemplo, o genótipo do DENV-2 oriundo do Sudeste Asiático, o genótipo do DENV-3 derivado da Índia e os genótipos nativos da América Central e do Sul são mais virulentos, sendo responsáveis pela maioria de surtos de FHD e SCD, ao mesmo tempo que os dois genótipos inicialmente referidos apresentam uma propensão superior ao desenvolvimento de infecções primárias com dengue grave (Rico-Hesse, 2007). No que se refere à idade do hospedeiro, as crianças, devido à fraca integridade dos vasos sanguíneos, estão mais predispostas a desenvolver derrame vascular aquando da SCD (Guzman *et al.*, 2010). Quanto ao sexo do hospedeiro, indivíduos do sexo feminino apresentam uma tendência superior a contrair dengue grave (Simmons *et al.*, 2012). Relativamente a patologias que constituem um risco para o doente, comorbilidades como asma, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, insuficiências cardíacas, renais e hepáticas, doenças do foro hematológico e auto-imune, entre outras, potenciam os episódios de dengue grave (Guzman *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2016).

Quanto à resposta imunitária ao DENV, o organismo humano ativa o sistema antiviral a partir da cascata de sinalização do interferão. Este mediador químico é produzido por várias células intervenientes no sistema imunitário, entre as quais as células *natural killer*, NK.

A atividade e síntese destas células encontram-se intimamente relacionadas com o agravamento da doença, visto que em situações de carácter leve a moderado da FD regista-se uma quantidade elevada de células NK e aumento da sua atividade, ao passo que o oposto verifica-se nas síndromes mais severas da doença.

Ao mesmo tempo, os doentes com síndromes de FD e FHD possuem níveis elevados de interferão alfa e gama, enquanto os doentes com SCD demonstram níveis reduzidos de interferão gama. Desta forma, a eficiência da resposta antiviral está correlacionada com os níveis de interferão na medida em que uma concentração sérica elevada indica que a resposta foi eficaz e níveis reduzidos revelam uma resposta ineficaz (Clyde *et al.*, 2006).

O interferão gama é sintetizado principalmente pelas células NK e pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que vão ativar os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e os macrófagos. Apesar de na replicação viral na célula alvo, o DENV bloquear o sinal de transdução do interferão, os macrófagos e os monócitos, por meio de produção de óxido nítrico (NO), bloqueiam a replicação do vírus (Clyde *et al.*, 2006; Faheem *et al.*, 2011). Concomitantemente, a síntese de NO pelos monócitos atrasa a progressão da fase aguda da doença e reduz a carga viral nestas células. Contudo, a síntese excessiva deste fator inflamatório, em conjunto com o fator tumoral de necrose alfa (TNF- $\alpha$ ), contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e deterioração das células endoteliais, potenciando os sintomas de dengue grave (Clyde *et al.*, 2006).

Para além do interferão, existem outros fatores imunológicos que podem contribuir para a severidade da infeção por DENV. Quando um indivíduo é previamente infetado por um serotipo do DENV, este adquire imunidade apenas contra o serotipo específico na infeção primária, sendo apenas conferida imunidade parcial ou temporária para os outros serotipos. A imunidade específica para um serotipo é devida à existência de anticorpos neutralizantes e de células T de memória, onde podem atuar simultaneamente. Os anticorpos anti-prM e anti-E inibem o vírus, e juntamente com os anticorpos anti-NS1 conferem imunidade. Como a imunidade é serotipo-específica, nos países onde coexistem vários serotipos, a probabilidade de conter uma infeção secundária com sintomatologia mais pronunciada é elevada (Clyde *et al.*, 2006; Screaton *et al.*, 2015).

A justificação deste facto deve-se à formação de imunocomplexos entre anticorpos resultantes da infeção primária ou derivados de baixas concentrações de anticorpos anti dengue de origem materna, e o serotipo heterólogo do vírus da infeção secundária. Estes anticorpos, em vez de neutralizarem o vírus, promovem a sua opsonização via recetores Fc $\gamma$  expressos em monócitos e macrófagos, por exemplo, o que resulta em níveis aumentados da descendência viral. Deste modo, ao mecanismo de amplificação da infeção denomina-se de imunoamplificação dependente de anticorpos (ADE), que contribui para o desenvolvimento de dengue grave (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2010; Screaton *et al.*, 2015). Outra estratégia usufruída pelo DENV para estimular o mecanismo ADE consiste na utilização de partículas virais imaturas. Neste contexto, apesar de serem consideradas não patogénicas, como a glicoproteína E encontra-se sob a forma de heterodímero prM-E, estão menos sujeitas à ação dos



anticorpos neutralizantes ao mesmo tempo que reagem cruzadamente com anticorpos anti-prM oriundos de infecções heterotípicas (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015; Screaton *et al.*, 2015). A ADE pode ainda ser desencadeada pela liberação excessiva de citocinas por parte das células apresentadoras de antígenos profissionais- células dendríticas, linfócitos B e macrófagos- células endoteliais e linfócitos T (Rico-Hesse, 2007).

As citocinas são dos intervenientes mais importantes na imunopatogênese do DENV, em parte devido à inflamação induzida nas células epiteliais. Das várias citocinas mediadoras deste processo, a que mais contribui para o aumento da permeabilidade vascular e, por consequência, para a gravidade da doença é a TNF- $\alpha$ . Outras citocinas que estimulam o desenvolvimento de dengue grave são as interleucinas 6,8 e 10 (Clyde *et al.*, 2006).

A indução da produção de citocinas inflamatórias é efetuada pelos anticorpos anti-NS1, que reagem cruzadamente com elementos conciliadores da hemóstase anteriormente referidos, o que estimula o aparecimento de coagulopatias características da infecção por DENV. A própria NS1 na corrente sanguínea, ao ligar-se ao glicocálix das células endoteliais, resulta na liberação de sulfato de heparina existente nos recetores, contribuindo também para o extravasamento plasmático (Clyde *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2012).

Outro elemento importante no desenvolvimento de dengue grave consiste na ação do sistema do complemento, ativado ou pela NS1 existente em circulação ou pela ligação entre anticorpos heterotípicos anti-NS1 nas infecções secundárias. Esta interação vai provocar a lise da célula hospedeira do vírus e a liberação de citocinas inflamatórias, o que resulta no derrame vascular constatado nos casos mais severos (Martina *et al.*, 2009).

Por último, estudos epidemiológicos indicam que existem determinados fatores genéticos do hospedeiro que influenciam a susceptibilidade ou resistência ao vírus. Os alelos da classe I e II dos antígenos leucocitários humanos, um polimorfismo no gene do TNF- $\alpha$  e o gene que codifica para o recetor Fc $\gamma$  são algumas condições que determinam a gravidade da infecção por DENV (Martina *et al.*, 2009). Outro exemplo que também contribui para a sensibilidade ao DENV consiste no sistema sanguíneo

ABO. Nas infecções secundárias, os indivíduos que possuam o grupo sanguíneo AB têm uma predisposição superior para desenvolver dengue grave, especialmente se forem infectados com os serotipos 2, 3 e 4. Contrariamente, nos grupos sanguíneos restantes, essa relação é inexistente (Kalayanarooj *et al.*, 2007).

Deste modo, é possível inferir que os sinais e sintomas verificados na infecção por DENV são instigados pelo próprio sistema imunitário. Por este motivo, de forma a desenvolver uma terapêutica antiviral adequada contra o vírus, é necessário o conhecimento de todos os mecanismos envolvidos na patogênese, desde da replicação viral na célula alvo até às diversas formas de evasão ao sistema imunitário (Clyde *et al.*, 2006).

## 6. DIAGNÓSTICO

Como a infecção por DENV apresenta uma elevada variabilidade de manifestações clínicas, que são comuns a outras doenças comunicáveis e não comunicáveis, a realização de um diagnóstico diferencial torna-se num desafio que implica uma avaliação de vários fatores que variam consoante a progressão da doença (Simmons *et al.*, 2012; WHO, 2012b). Sempre que um indivíduo viaje para uma área endémica, que tenha estado em contacto com o vetor e que demonstre uma semiologia concordante com a classificação atual da infecção, a concretização de um diagnóstico diferencial deve ser considerada (Direção-Geral da Saúde, 2012; WHO, 2012b). Na Tabela 1 estão representadas várias patologias cujas características clínicas são semelhantes à infecção por DENV.

**Tabela 1:** Doenças infecciosas e não infecciosas a considerar aquando da realização de um diagnóstico diferencial de uma infecção por DENV. (Adaptada de: Pan American Health Organization, 2017; Simmons *et al.*, 2012; WHO, 2012b).

Diagnóstico diferencial da infecção por DENV
<b>Arboviroses por:</b> Vírus Zika, Vírus Chikungunya, Vírus do oeste do Nilo, Vírus da encefalite japonesa, Vírus da febre amarela
<b>Outras infeções virais:</b> Rubéola, Gripe, Mononucleose infecciosa, Rotavírus, seroconversão para VIH, Sarampo, Hepatite vírica, Síndrome pulmonar por hantavírus
<b>Infeções bacterianas:</b> Escarlatina, Infeções provocadas por meningococos, Sepsis, Febre tifóide, Rickettsiose, Leptospirose
<b>Infeções parasitárias:</b> Malária
<b>Doenças não transmissíveis:</b> Lupus eritematoso sistémico, Anemia hemolítica, Leucemia, Linfoma, Cetoacidose diabética, Doença de Kawasaki

Após a execução do diagnóstico diferencial e da restante avaliação geral, que inclui o começo das manifestações febris, quantidade de líquidos ingeridos, débito urinário, deteção de sinais clínicos de alerta, existência de alterações do estado de consciência, de comorbilidades e respetiva medicação, segue-se uma apreciação dos parâmetros laboratoriais do doente, preferencialmente efetuada na primeira visita.

O profissional de saúde, como prática clínica para com os doentes, é aconselhado a prescrever um hemograma completo, uma vez que sinais laboratoriais como leucopenia, trombocitopenia e aumento do hematócrito são indícios de extravasamento

plasmático, uma determinação de concentrações séricas dos iões sódio, potássio e cálcio, medição da glicémia plasmática venosa e testes de função hepática e renal. Caso a semiologia da doença o requeira, pode ser necessária a realização de exames complementares como o electrocardiograma, radiografia ao tórax e testes laboratoriais às enzimas cardíacas (DGS, 2012a; WHO, 2012b). A execução deste diagnóstico preliminar é especialmente importante nos casos endémicos, dado que ao detetar precocemente casos clínicos consegue-se aferir atempadamente a identidade e origem do agente etiológico do surto e implementar medidas de prevenção e controlo (Alves *et al.*, 2013). Porém, em determinadas situações, é impossível realizar o diagnóstico no momento da infeção. Nestes casos, a concretização de um diagnóstico prévio a partir das manifestações clínicas apresentadas e do histórico de viagens do indivíduo infetado consiste na metodologia mais adequada. Sendo o período de incubação do vírus inferior a duas semanas, ao escrutinar o historial de deslocações do doente, é possível excluir outras patologias (Bäck & Lundkvist, 2013).

O diagnóstico definitivo é concebido através de diversos métodos laboratoriais, que incluem a deteção direta dos elementos do vírus e a deteção indireta a partir de técnicas serológicas. Na concretização destes ensaios laboratoriais são utilizados vários marcadores virológicos, como por exemplo ARN viral, antigénios virais e anticorpos específicos anti-DENV. Das diversas técnicas de deteção, o isolamento viral, os testes de amplificação de material genético e de serologia são as mais empregues (Bäck & Lundkvist, 2013; Simmons *et al.*, 2012).

A sensibilidade de cada metodologia depende da duração da infeção e do período em que é realizada. Ou seja, por norma a fase de virémia é detetada simultaneamente com o surgimento dos sintomas, sendo considerada indetetável a partir da fase aguda. Por outras palavras, é na fase inicial da infeção que é possível detetar constituintes virais e outros produtos derivados da replicação na célula hospedeira. A partir da deteção de genoma viral por ensaios de amplificação com a transcriptase reversa (RT-PCR), da glicoproteína NS1, por ELISA ou por testes rápidos e ainda pela cultura do vírus, adquirem-se dados satisfatórios para a criação de um diagnóstico correto (Simmons *et al.*, 2012; WHO, 2012b).

No período entre as fases febril e aguda, é possível detetar a presença das imunoglobulinas M (IgM) e IgG específicas para o DENV. Para tal, utilizam-se testes de diagnóstico tais como o MAC-ELISA, técnica imunoenzimática própria para a deteção de IgM, IgG-ELISA e testes de inibição da hemaglutinação (WHO, 2012b).

Ao mesmo tempo, os marcadores virais e serológicos variam consoante uma infeção primária ou secundária. No primeiro caso, a carga viral normalmente é detetada 1 a 2 dias antes do surgimento das manifestações febris até ao quinto dia da doença. As IgM são as primeiras imunoglobulinas a aparecer, podendo ser detetadas 3 a 6 dias depois da fase febril. Tendem a aumentar drasticamente durante a segunda semana da infeção e diminuem com o passar do tempo. Já as IgG são apenas detetáveis ao fim da primeira semana da infeção, incrementam lentamente e podem durar vários anos em circulação, ao contrário das IgM que persistem aproximadamente dois meses. Nas infeções secundárias, apesar do estreitamento do tempo de replicação viral, a carga viral detetada é superior em relação às infeções primárias. Quanto à resposta imunitária resultante, a quantidade de IgG produzidas pelas células B de memória da infeção primária é significativamente superior quando comparada com a concentração de imunoglobulinas IgM (Guzman *et al.*, 2010; WHO, 2012b).

Relativamente à colheita de amostras biológicas para análise laboratorial, caso estejam sujeitas a temperaturas acima dos 30 °C, ocorre a degradação das partículas virais por perda do invólucro lipídico, o que inviabiliza o diagnóstico da infeção. Por este motivo, caso se trate de uma amostra de soro para deteção de genoma viral ou de antígenos, recomenda-se o armazenamento das amostras a 4 °C se forem utilizadas no máximo até 48 horas após colheita.

Se a concretização da análise não for possível durante este período, é aconselhável recorrer-se à congelação da amostra a -70 °C. Caso a amostra em causa seja usada para ensaios serológicos, é preferível o armazenamento a 4 °C durante períodos inferiores a 24 horas ou a -20 °C para intervalos de tempo superiores. Caso o doente apresente manifestações neurológicas, recomenda-se a recolha de líquido cefalorraquidiano para posterior análise, procedendo de forma idêntica ao descrito anteriormente.

A dissecação de tecidos derivados de autópsia consiste noutro tipo de amostra que é utilizada para o isolamento do vírus, para detetar genoma viral e antígenos. Os tecidos derivados do fígado, baço, gânglios linfáticos e timo constituem os melhores

espécimes. A preservação destas amostras deve ser efetuada logo após a respetiva colheita, podendo ser congeladas a -70 °C ou transportadas a 4 °C para análise laboratorial, se for executada no próprio dia (Bäck & Lundkvist, 2013; DGS, 2012a; WHO, 2012b).

A Tabela 2 representa sumariamente uma descrição dos parâmetros laboratoriais utilizados para o estabelecimento de uma infeção definitiva ou provável, características das amostras, os métodos laboratoriais correspondentes e respetivas vantagens e desvantagens.

**Tabela 2:** Critérios laboratoriais para infeções confirmadas ou prováveis, tipo de amostras utilizadas, metodologia correspondente e vantagens e desvantagens dos mesmos. (Adaptada de: Bäck & Lundkvist, 2013; CDC, 2017; Guzman *et al.*, 2010; Peeling *et al.*, 2010; WHO, 2012b).

Diagnóstico laboratorial	Amostras	Metodologia	Vantagens	Desvantagens
Isolamento do vírus	Soro colhido até ao quinto dia de febre ou tecidos autopsiados	Inoculação em linhas celulares C6/36 de <i>A. albopictus</i> e posterior serotipagem por imunofluorescência com anticorpos monoclonais serotipo-específicos	Confirmação da infeção Método mais específico; Identificação do serotipo etiológico	Profissionais especializados e instalações adequadas; Dispendioso; Não distingue infeção primária de secundária; Amostra recolhida na fase aguda; Demorado (> 1 semana)
Deteção do genoma viral		RT-PCR com posterior eletroforese em gel de agarose	Confirmação da infeção Serotipagem e genotipagem; Resultados entre 24-48 horas	Risco de contaminação (possível presença de falsos positivos); Amostra recolhida na fase aguda; Profissional especializado e equipamento dispendioso; Não diferencia infeção primária de secundária
		RT-PCR em tempo real	Confirmação da infeção; Resultados obtidos em menos de 2 horas; Controlo da progressão da doença; Redução de contaminações; Serotipagem e genotipagem; Não necessita de eletroforese	Amostra recolhida na fase aguda; Profissional especializado e equipamento dispendioso; Não diferencia infeção primária de secundária

Deteção de antígenos		NS1-ELISA	Confirmação da infecção; Resultado obtido em 24 horas	Menos sensível que isolamento do vírus e deteção de ARN viral
		Teste rápido para a glicoproteína NS1	Confirmação da infecção; Resultado obtido em minutos	Menos sensível que isolamento do vírus e deteção de ARN viral
		Imunohistoquímica (observação de antígenos virais por ligação com mAbs que contêm marcadores específicos como corantes fluorescentes e enzimas)	Confirmação da infecção	Necessita de especialista em Patologia; Menos sensível que isolamento do vírus e deteção de ARN viral
Seroconversão de IgM ou IgG (ver nota)	Comparação entre soro obtido até ao quinto dia de febre e duas semanas depois	ELISA IgG-ELISA (permite diferenciar infecção primária de secundária) Ensaio de neutralização por redução em placas (PRNT) ou micro neutralização	Confirmação da infecção; Fácil utilização; Menos dispendioso; Diferencia infecção primária de secundária	Níveis séricos de IgM em infecções secundárias baixos; Confirmação necessita de duas amostras; Ensaio de neutralização demorados (> 1 semana)
IgM positiva	Soro colhido após o quinto dia de febre	MAC-ELISA (técnica imunoenzimática mais sensível e específica se se utilizar soro recolhido depois do quinto dia de febre)	Identificam casos prováveis	Níveis séricos de IgM em infecções secundárias baixos; Amostra recolhida apenas depois da fase inicial da doença; Incapacidade de identificação do serotipo devido ao risco de reações cruzadas com outros anticorpos derivados de infecções por outros membros da família Flaviviridae
Concentração de IgG elevada, por confirmação com teste de inibição da hemaglutinação (título $\geq 1280$ )		IgG-ELISA e teste de inibição da hemaglutinação		Incapacidade de identificação do serotipo pelo motivo idêntico ao anterior; Amostra recolhida apenas depois da fase inicial da doença

**Nota:** Na primeira coluna da tabela, no caso de **seroconversão de IgM ou IgG**, a confirmação da infecção entende-se por IgM negativa no soro colhido na fase inicial e IgM positiva no soro obtido quinze dias depois e por IgG negativa no soro colhido na fase inicial e IgG positiva no outro soro (se for uma infecção primária) ou por um aumento de quatro vezes verificado nas concentrações de IgG nos dois soros (se for uma infecção secundária).

## 7. TRATAMENTO CONVENCIONAL

A abordagem terapêutica na infecção por DENV é estritamente sintomática, devido à variabilidade de sintomas e à inexistência de tratamento antiviral específico. Ao mesmo tempo, consoante a monitorização dos parâmetros laboratoriais e a avaliação global do doente, o profissional de saúde define se está na presença de uma infecção por DENV, qual o estágio correspondente e respetiva fase e adapta a terapêutica à situação presente (WHO, 2012b).

Conforme as manifestações clínicas do doente e outras condições, procede-se à alocação do mesmo num dos seguintes grupos, que incluem doentes para tratamento em ambulatório (grupo A), internados (grupo B) e ainda os que necessitam de tratamento de emergência (grupo C) (DGS, 2012a).

No **grupo A** são incluídos os doentes que não apresentam sinais de alerta principalmente nos primeiros dois a três dias após remissão da febre, que estejam aptos à administração de líquidos por via oral e cuja frequência urinária corresponda no mínimo a uma vez por cada seis horas. A terapêutica para os doentes que estejam incluídos nesta classificação consiste na reposição de fluidos através de soluções de rehidratação oral, de forma a compensar perdas de glucose e eletrólitos por febre e vómitos, Paracetamol como analgésico e antipirético, métodos de arrefecimento corporal, como por exemplo banhos com água morna, e repouso. Como contraindicações nestes doentes e nos restantes grupos constam a administração de anti-inflamatórios não esteróides e de glucocorticoides, devido ao risco acrescido de hemorragias e ao efeito imunomodulador, respetivamente, e a ingestão de líquidos semelhantes com a emissão de sangue vivo ou digerido em caso de emese, como por exemplo Coca-Cola (Bäck & Lundkvist, 2013; DGS, 2012a).

Apesar destes doentes poderem ser tratados em casa, devem recorrer aos serviços de saúde sempre que apresentem alguma alteração do seu estado que incite manifestações clínicas hemorrágicas e de comprometimento vascular, bem como de outros sinais de alerta, nomeadamente dores abdominais intensas e vómitos constantes. Por este motivo, a monitorização hematológica diária e de sinais de alerta nestes indivíduos é crucial (Simmons *et al.*, 2012; WHO, 2012b).



Caso o doente apresente sinais de alerta de progressão da doença e/ou fatores que condicionem o tratamento da infeção, como gravidez ou período pós-parto, idade avançada ou reduzida, historial de convulsões febris na infância, comorbilidades que possam exacerbar a sintomatologia da infeção e/ou que se encontre numa situação social precária é inserido no **grupo B**. Este grupo é ainda dividido em dois subgrupos, B1 e B2, que incluem, respetivamente, doentes sem e com sinais de alerta (WHO, 2012b).

Nos doentes pertencentes ao **grupo B1**, a terapêutica paliativa é idêntica à do grupo A, exceto nas situações em que os indivíduos demonstram incapacidade para administração por via oral. Nestes casos, administra-se soro fisiológico ou solução de lactato de Ringer com ou sem glucose via intravenosa durante um a dois dias e Paracetamol pela mesma via de administração. A dose de soro fisiológico ou solução de lactato de Ringer a administrar, que normalmente está contida no intervalo entre 2 a 4 mg/kg/hora, deve ser vigiada e adaptada consoante as comorbilidades do indivíduo, de forma a evitar sobredosagens e efeitos iatrogénicos resultantes. A retoma à via oral concretiza-se, por norma, passadas umas horas após a fluidoterapia intravenosa (Pan American Health Organization, 2017; Simmons *et al.*, 2012). A monitorização a efetuar pelo profissional de saúde consiste em interpretar amplitudes térmicas, balanços hídricos, débitos urinários e verificar a existência de sinais clínicos e laboratoriais de alerta (DGS, 2012a).

Em comparação com os critérios clínicos e laboratoriais do grupo B1, para os indivíduos categorizados no **grupo B2**, por se inserirem num contexto clínico mais débil, é necessária uma avaliação mais detalhada da semiologia do doente. Os critérios incluem a monitorização do balanço hídrico, de sinais vitais como a pulsação e a pressão arterial, da temperatura das extremidades corporais e cianose em cada 1 a 4 horas, débito urinário de 4 em 4 ou 6 em 6 horas, hematócrito antes e após a rehidratação do doente com repetição de 6 em 6 horas ou 12 em 12 horas, glicemia e outros ensaios laboratoriais segundo o grau de deterioração orgânica, como testes de função hepática e renal (DGS, 2012a). Para a reposição de fluidos, inicia-se a administração das mesmas soluções para fluidoterapia utilizadas nos doentes do grupo B1, mas em doses e intervalos de tempo distintos. Ou seja, nas primeiras 1 a 2 horas de fluidoterapia intravenosa administra-se entre 5 a 7 mg/kg/hora, reduzindo-se nas 2 a

4 horas seguintes para 3 a 5 mg/kg/hora e depois para dose de manutenção (2 a 4 mg/kg/hora), dependendo da semiologia do doente. Nesta etapa, o profissional de saúde deve reavaliar o quadro clínico do doente e requisitar um novo hematócrito, para comparação com o efetuado inicialmente. Se o hematócrito for semelhante ou apresentar um aumento ténue, é aconselhável administrar a dose de manutenção durante 2 a 4 horas; caso o aumento do hematócrito seja significativo, recomenda-se a administração a 5 a 10 mg/kg/hora por 1 a 2 horas (DGS, 2012a). Depois desta fase, o profissional de saúde procede à reavaliação das manifestações clínicas do doente, solicita uma nova análise dos parâmetros laboratoriais, incluindo a requisição do hematócrito, e adapta a fluidoterapia intravenosa em função dos sinais clínicos e laboratoriais. De forma a manter uma perfusão tecidual e débito urinário adequados, é recomendável a administração mínima de 0,5 mg/kg/hora de soluções cristalóides até à estabilização do doente (WHO, 2012b).

Se eventualmente se verificar uma disfunção dos sinais vitais e aumento do hematócrito no doente, aconselha-se à realocação do mesmo para o **grupo C** (Pan American Health Organization, 2017). Nos indivíduos com SCD, à semelhança do grupo anterior, a inserção de fluidos por via intravenosa é fundamental para a restituição do volume intravascular. Caso o estado clínico se mantenha inalterado com a fluidoterapia, administram-se soluções à base de amido ou dextrano, com o intuito de assegurar um preenchimento vascular apropriado, evitando a formação de edemas e disfunção de órgãos. A metodologia para a adaptação da fluidoterapia neste grupo é semelhante ao grupo B2, podendo nalgumas situações ser necessário o aumento do aporte de fluidos. Quando os indivíduos demonstram sinais de hemorragia grave com falência de órgãos, a transfusão de sangue, hemodiálise e terapêutica adjuvante com vasopressores podem ser abordagens a considerar. Os parâmetros a monitorizar nestes indivíduos são semelhantes aos pertencentes ao grupo B2, mas em intervalos de tempo mais curtos. Ou seja, para a temperatura corporal e cianose, é recomendável a verificação a cada 15 a 30 minutos até à recuperação do choque e posteriormente de 1 a 2 horas, e para o débito urinário em cada hora até ao restabelecimento da hemóstase e seguidamente de 1 a 2 horas (Bäck & Lundkvist, 2013; DGS, 2012a; Simmons *et al.*, 2012).

A alta clínica é conferida ao doente consoante a confirmação de todos os parâmetros seguintes, que incluem a ausência de febre em 48 horas, melhoria do estado clínico em termos respiratórios, hemodinâmicos, urinários e de alimentação, aumento da contagem de plaquetas e hematócrito estável sem reposição de fluidos (WHO, 2012b).

## **8. ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E CONTROLO DA INFECÇÃO**

As metodologias atualmente conhecidas para a prevenção e controlo da infeção por DENV consistem no combate aos vetores transmissores do vírus, e, recentemente na vacinação. Para ambas as medidas serem devidamente eficazes, é necessária a cooperação entre as entidades governamentais e não governamentais, prestadores de cuidados de saúde e a comunidade (Summers, 2016 ;WHO, 2012a).

Para garantir a sustentabilidade da prevenção e controlo da infeção, é recomendável que a comunicação às populações seja efetuada de forma clara, concisa e não alarmista, tendo em vista medidas para a diminuição da proliferação dos artrópodes, como a destruição de focos populacionais dos mosquitos e implementação de medidas de prevenção pessoais, tais como a utilização de repelentes. Juntamente com a educação da comunidade, a instalação de infraestruturas que evitem o armazenamento de água propício ao desenvolvimento de ovos e larvas, gestão de resíduos sólidos e a implementação de medidas legislativas que visem a responsabilização e a criação de incentivos às populações integram programas de erradicação dos mosquitos (Achee *et al.*, 2015; DGS, 2012b; Guzman *et al.*, 2010).

Assim, de uma forma geral, as estratégias de prevenção e controlo da infeção por DENV baseiam-se em cinco fundamentos, que consistem no controlo do vetor, vigilância eficaz da doença, preparação dos serviços de saúde, envolvimento de painéis de peritos e a pesquisa e desenvolvimento de novos métodos de controlo de vetores (Guzman *et al.*, 2010).

### **8.1 Aplicações no vetor**

#### **8.1.1 Métodos químicos**

As técnicas de controlo vetorial fundamentadas em produtos químicos atuam em várias fases do ciclo de desenvolvimento do mosquito, desde a fase de larva até à fase adulta. Estas substâncias podem ser adicionadas em águas armazenadas em ambientes rurais ou domiciliários, dado que a água constitui o local de desenvolvimento destes artrópodes (Achee *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2010).

Desde 1970, têm sido utilizados vários agentes químicos nas águas, nomeadamente o larvicida organofosforado temefos. Porém, a eficácia contra o principal vetor transmissor do vírus e os potenciais risco de utilização para o Homem têm sido postos em questão. Ou seja, ao empregar este larvicida por intervalos de tempo prolongados, o mosquito *A. aegypti* pôde desenvolver mecanismos biológicos de resistência ao temefos pelo aumento de esterases inespecíficas, inibindo o efeito inseticida deste organofosforado. Ao mesmo tempo, o mecanismo de ação nos mosquitos por inibição da acetilcolinesterase encontra-se associado às manifestações clínicas no Homem advindas pela exposição ocupacional, principalmente por via inalatória. A semiologia de exposição por temefos traduz-se por náuseas, vômitos, diarreia e em situações mais severas, convulsões, paragem respiratória e morte (Santacoloma, Chaves, & Brochero, 2012; Toxicology Data Network, 2010). Outros inseticidas pertencentes à mesma classe, como é o caso do malatión, que atua na fase adulta do mosquito, apesar de ser considerado mais seguro em termos de manipulação, têm sido produzidas resistências contra este inseticida (Santacoloma *et al.*, 2012).

Outras classes de inseticidas utilizadas na prevenção e controlo da infeção por DENV consistem nos reguladores de crescimento dos mosquitos, como é o caso do diflubenzuron, metopreno, piriproxifeno e novaluron; piretróides, como a permetrina e a deltametrina; carbamatos, como o propoxur; e organoclorados, como o DDT (Santacoloma *et al.*, 2012; WHO, 2009).

De forma a mitigar a resistência aos inseticidas é necessária a execução de medidas de controlo da sua utilização, principalmente em países endémicos. A rotação e moderação da utilização destes produtos inseticidas constituem estratégias a adotar nestas regiões. Todavia, estas substâncias têm um elevado impacto ambiental em termos de contaminação dos solos, lagos, oceanos e do ar, interferindo na qualidade de determinados alimentos. Consequentemente, a exposição prolongada a inseticidas traduz-se em efeitos nocivos para o Homem. Por este motivo, a pesquisa e desenvolvimento de métodos alternativos que não sejam prejudiciais para o ambiente, como a utilização de métodos biológicos, constitui uma necessidade eminente (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009; Santacoloma *et al.*, 2012).

### 8.1.2 Métodos biológicos

O controlo biológico consiste na utilização de técnicas que envolvem a manipulação de predadores e de plantas medicinais como agentes biocidas, indução de alterações do comportamento dos vetores e na criação de mosquitos estéreis ou inaptos à transmissão de agentes patogénicos. Estes métodos atuam em diferentes fases do ciclo de vida dos mosquitos e contribuem para a manutenção da sustentabilidade do ambiente (Benelli, Jeffries, & Walker, 2016).

Relativamente ao emprego de agentes patogénicos para os artrópodes, a utilização de fungos, bactérias e crustáceos copépodes tem sido considerada como alternativa aos inseticidas químicos (Benelli *et al.*, 2016).

De acordo com Bilal *et al.* (2012), fungos entomopatológicos da espécie *Metarhizium anisopliae* demonstraram atividade larvicida. Esta espécie é específica para o vetor, não constituindo uma ameaça para as outras espécies. Ao mesmo tempo, a sua produção não acarreta riscos ambientais e de manipulação, sendo economicamente rentável e biodegradável (Bilal, Hassan, & Khan, 2012). Outra vantagem da utilização de fungos entomopatológicos consiste na menor probabilidade de aquisição de resistências por parte dos mosquitos em comparação aos inseticidas químicos. Este facto é justificado pela produção de várias toxinas por parte dos fungos entomopatológicos, o que dificulta o aparecimento de resistências nos mosquitos (Benelli *et al.*, 2016).

Outra estratégia em estudo consiste na utilização da bactéria endossimbiótica *Wolbachia* presente em vários artrópodes, como *A. albopictus*, para a inibição da replicação do DENV no mosquito *A. aegypti*. Esta técnica, para além de bloquear a replicação viral, permite diminuir o tempo médio de vida de *A. aegypti*, alterando a morfologia das “abas” bucais sugadoras, e a fecundidade do mesmo. Os artrópodes são infetados com *Wolbachia* em laboratório, e os mosquitos adultos e os ovos infetados são deliberadamente libertados, com o intuito de reduzir ou erradicar populações de *A. aegypti*. Por consequência, a transmissão de várias arboviroses, incluindo o DENV, diminuíu (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2017).

Uma técnica atualmente disponível no mercado em vários países da Europa, incluindo Portugal, reside no uso da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) como larvicida de *A. aegypti* e de *A. albopictus*. Apesar das toxinas libertadas pela Bti serem eficazes como larvicidas, uma exposição prolongada deste agente biocida incita a produção de resistências, para além de a sua utilização em locais de reprodução de grandes dimensões ser pouco adequada (Benelli *et al.*, 2016; DGS, 2012b).

O uso de crustáceos copécodes como larvicidas dos primeiros dois estágios de *A. aegypti* consiste noutra técnica utilizada. Apesar de esta metodologia ser eficaz, necessita de instalações e especialistas que proporcionem condições adequadas à produção em massa, bem como de indivíduos responsáveis pela manutenção e reintrodução destes copécodes nos locais de desenvolvimento larvar (Achee *et al.*, 2015; Guzman *et al.*, 2010).

## 8.2 Aplicações para o Homem

### 8.2.1 Vacinação

Em dezembro de 2015, no México, foi licenciada a primeira vacina contra o DENV, Dengvaxia<sup>®</sup>, desenvolvida pelo laboratório *Sanofi Pasteur*. A Dengvaxia<sup>®</sup> consiste numa vacina viva atenuada, quimérica, tetravalente e produzida por tecnologia de ADN recombinante (Sanofi Pasteur, 2016).

A imunoproteção conferida por esta vacina é devida à combinação entre os antígenos dos serotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus e a estirpe utilizada na vacina viva atenuada do vírus da febre amarela (YF-17D). Ou seja, cada serotipo recombinante do DENV é obtido através da substituição dos genes que codificam para a prM e E existentes no genoma da estirpe da vacina YF-17D pelos genes correspondentes dos serotipos 1, 2, 3 e 4 *wild type*, permitindo, desta forma, a formação de partículas virais vivas atenuadas quiméricas (Nolan *et al.*, 2016; Sanofi Pasteur, 2016).

A Dengvaxia<sup>®</sup> tem indicação terapêutica para indivíduos com idades compreendidas entre os 9 e os 45 ou 60 anos de idade, pendente da obtenção da autorização de

introdução no mercado, e que habitem regiões endémicas do DENV. O regime de administração é constituído por três doses de 0,5 ml, administradas de 6 em 6 meses por via subcutânea. Atualmente, a Dengvaxia® encontra-se registada em mais 18 países, pertencentes à América Central e do Sul, Sudeste Asiático, Ilhas do Sul do Pacífico e Austrália (Nolan *et al.*, 2016; Sanofi Pasteur, 2016, s.d.).

Apesar de esta vacina conferir imunidade parcial contra os serotipos 1 a 4 do vírus, permite que a incidência de casos de dengue grave e de hospitalizações diminua substancialmente, e, por consequência, reduza os custos associados aos sistemas de saúde e a carga global da doença. Contudo, como referido anteriormente, não é unicamente a vacinação que contribui para a diminuição da transmissão do vírus. Para atingir este objetivo, é necessário um esforço conjunto entre os vários intervenientes na articulação entre as metodologias de controlo dos vetores e da vacinação (Nolan *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2017; Sanofi Pasteur, 2016).

### 8.2.2 Proteção individual e de habitação

De entre as várias medidas existentes ao nível da proteção individual, a utilização de roupas de manga comprida, calças e calçado fechado constituem a metodologia mais simples para mitigar a picada dos vetores transmissores do DENV, principalmente em surtos epidémicos. Esta técnica pode ser colmatada com a aplicação de repelentes na roupa ou nas áreas expostas do corpo como N,N-dietil-meta-toluamida (DEET), etilbutilacetilaminopropionato (IR 3535®), icaridina, para-metano-3,8-diol ou 2-undecanona (CDC, 2017a; Instituto de Higiene e Medicina Tropical, s.d.; WHO, 2009).

Dos vários repelentes acima mencionados, o DEET, repelente de origem química, é considerado um padrão por excelência devido ao facto de ser considerado relativamente seguro para a população em geral, pouco volátil, o que permite prolongar o tempo de proteção, e eficaz, uma vez que para além de manter os artrópodes afastados do local de picada, isto é, atuar como repelente espacial, é também um repelente por contacto pela ação ao nível do sistema gustativo dos mesmos (Leal, 2014). De forma a surtir o efeito desejável, é aconselhável a aplicação de repelentes que contenham um teor de DEET entre 20 a 35% no caso dos adultos e de 10% para crianças, sendo que o uso deste repelente é contraindicado em crianças



com idade inferior a 2 anos. A título de exemplo, existem vários repelentes à base de DEET no mercado, como é o caso da gama PREVIPIQ<sup>®</sup>, comercializada em Portugal pelo *Grupo Medinfar*, que confere entre 6 a 12 horas de proteção da picada de mosquitos do género *Aedes* consoante a apresentação e concentração de DEET existente. No entanto, caso o seu emprego se efetue em ambiente tropical, é recomendável a sua renovação a cada quatro horas, devido ao risco acrescido de transmissão de doenças por vetores. Esta recomendação é também extensível aos outros repelentes (CDC, 2017a; Grupo Medinfar, 2017; Instituto de Higiene e Medicina Tropical, s.d.).

Este repelente, à semelhança dos anteriormente referidos, não deve ser aplicado em mucosas, zonas sensibilizadas da pele ou dos olhos. No caso específico do DEET, esta exposição encontra-se associada ao desenvolvimento de dermatite de contacto, exacerbações de dermatite seborreica ou de acne *vulgaris* e de conjuntivite. Para além destes efeitos indesejáveis, este repelente apresenta um odor característico semelhante a amónia, sendo considerado um carácter organoléptico pouco apelativo para a sua utilização (Pubchem, s.d.b).

Em contraste com o DEET, o IR 3535<sup>®</sup>, comercializado pela *Merck KGaA*, consiste num repelente cuja estrutura química é baseada num  $\beta$ -aminoácido, denominado  $\beta$ -alanina, sendo considerado um biopesticida repelente odorante. Pode ser utilizado a partir dos 6 meses de idade e confere proteção até 8 horas consoante a concentração utilizada na formulação, que apresenta um teor de 10% ou 20%. Tem também indicação para uso veterinário, mas para teores entre os 10% e os 30% (Iberoquímica magistral, 2016).

A icaridina, também conhecida por picaridina, consiste num repelente piperidínico reproduzido por síntese química cuja molécula se assemelha à piperina, composto ativo existente em plantas do género *Piper*. Apesar de uma exposição prolongada a este repelente estar associada à ocorrência de dermatite de contacto e de eritema, é considerada uma alternativa viável em indivíduos alérgicos ao DEET. Consoante o grupo etário do indivíduo, aplicam-se teores de icaridina diferentes, isto é, em adultos recomenda-se a utilização de 20% de icaridina, ao passo que em crianças aconselha-se 10% (Gervais, Wegner, Luukinen, Buhl, & Stone, 2009; Instituto de Higiene e Medicina Tropical, s.d.; Pubchem, s.d.a).

Quanto ao para-metano-3,8-diol e ao 2-undecanona, que apenas podem ser utilizados em crianças a partir dos 3 anos de idade, por serem repelentes de origem

vegetal serão retratados no capítulo a seguir (CDC, 2017a; Witting-bissinger *et al.*, 2008).

Relativamente a medidas a empregar em ambiente doméstico, destacam-se a utilização de objetos impregnados com inseticidas e de armadilhas para os ovos dos mosquitos. No primeiro caso usam-se inseticidas como a permetrina ou a deltametrina em cortinas, redes mosquiteiras (de preferência colocadas nas portas, janelas e em camas) e no próprio vestuário. No segundo caso, usam-se preferencialmente armadilhas impregnadas com inseticidas no local de deposição dos ovos dos mosquitos, que têm como vantagens serem de aplicação simplificada, específicas e efetivas contra os vetores transmissores do DENV e ainda a possibilidade de conjugação com metodologias químicas ou biológicas (Instituto de Higiene e Medicina Tropical, s.d.; WHO, 2009).

## 9. FITOTERAPIA COMO TRATAMENTO E PROFILAXIA

A Fitoterapia consiste no tratamento de doenças transmissíveis e não transmissíveis através da seleção de plantas, de acordo com as substâncias ativas constituintes, com posterior cultivo nas condições adequadas e colheita quando apresentam o teor máximo possível desses compostos (Proença da Cunha, José Teixeira, Pereira da Silva, & Rodrigues Roque, 2010). O atual conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas advém da junção entre a inventariação dos procedimentos tradicionais da preparação e administração de medicamentos à base de plantas para tratamento de doenças em populações indígenas, estudos fitoquímicos e farmacológicos baseados em ensaios de atividade biológica *in vitro*, *in vivo* em animais e ensaios clínicos em humanos. (Teixeira Gomes, 2005).

Desta forma, a partir de investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas, identificaram-se várias plantas medicinais com potencial para o desenvolvimento de terapêuticas paliativas e curativas contra o DENV, bem como várias medidas de combate aos vetores, nomeadamente a utilização de repelentes (Abd Kadir *et al.*, 2013; Mehboob *et al.*, 2015).

### 9.1 Plantas medicinais com principal relevância em fitoterapia como tratamento e profilaxia para a infecção por DENV

Através da pesquisa de artigos científicos nas bases de dados anteriormente referidas, selecionaram-se várias plantas medicinais de acordo com o seu grau de pertinência para o tema apresentado, isto é, se existem sob forma de medicamento ou não, se possuem inovações terapêuticas relevantes patenteadas ou se contribuem para a prevenção da infecção por DENV.

#### 9.1.1 *Cissampelos pareira* Linn

*Cissampelos pareira* Linn, de nome comum Abuta ou “folha de veludo”, pertence à família *Menispermaceae*, e é uma planta trepadeira delgada (Shah, Qureshi, Gupta, Upmanyu, & Chauhan, 2017). Encontra-se distribuída por várias regiões do globo, principalmente nas florestas tropicais e subtropicais da Ásia, América Central e do Sul e África. Na medicina tradicional indiana, no ramo Ayurveda, apesar de *C.*

*pareira* L. não ser mencionada como tratamento específico da febre do dengue, é considerada como tendo propriedades analgésicas e antipiréticas, que são benéficas na terapêutica paliativa da infecção por DENV (Shah *et al.*, 2017). Esta planta medicinal é ainda tradicionalmente utilizada noutras partes do globo, nomeadamente no Brasil, como analgésico por via oral, a partir da decocção das folhas e caules (Amresh, Zeashan, Rao, & Singh, 2007).

Desta forma, através da caracterização fitoquímica das partes aéreas, isto é, dos frutos, flores, sementes, folhas e caules, surgiram vários estudos para investigar a atividade dos compostos ativos desta planta na infecção por DENV. As partes aéreas desta planta medicinal possuem as ações acima referidas devido à existência do dímero de chalcona-flavona, denominado cissampeloflavona, e pelos alcalóides nuciferina, bulbocarpina, corituberina, laudanosina e cloridrato de magniflorina (Shah *et al.*, 2017). A Figura 12 ilustra alguns constituintes das partes aéreas de *C. pareira* L., tais como folhas, frutos e caule.



**Figura 12:** Representação dos frutos, folhas e caules de *C. pareira* L.  
(Retirado de: Pakistan Agricultural Research Council, 2016)

Bhatnagar *et al.* (2012) patenteou a atividade antiviral de extratos metanólico, hidroalcoólico e aquoso de partes aéreas de *C. pareira* L. na infecção por DENV. A experiência consistia na avaliação antivírica de extratos metanólico, hidroalcoólico e aquoso a partir de três ensaios sequenciais distintos- ensaio de neutralização por redução em placas (PRNT) convencional, PRNT modificado e redução da carga viral (Patente Europeia N.º 2389184 B1, 2012).

No PRNT convencional, os resultados foram expressos em 50% de diminuição do número de placas contadas, utilizando como referência o número de placas formadas pelo vírus na ausência dos extratos vegetais (PRNT<sub>50</sub>). Dos três extratos vegetais, o que demonstrou um PRNT<sub>50</sub> inferior foi o extrato metanólico (1,2-11,1 µg/ml), o que indica que é o melhor extrato capaz de bloquear a entrada dos vírus nas células susceptíveis (Patente Europeia N.º 2389184 B1, 2012).

No PRNT modificado, em semelhança aos resultados anteriores, o extrato metanólico apresentou um PRNT<sub>50</sub> inferior (78-125 µg/ml), o que demonstra a capacidade em inibir vírus dentro da célula alvo (Patente Europeia N.º 2389184 B1, 2012).

Na redução da carga viral, os resultados foram expressos em redução de logaritmo (log) nas diferentes fases de amostragem, confrontando-os com as concentrações de extratos e comparando-os com o controlo positivo. Em conformidade com os resultados obtidos nos ensaios anteriores, o extrato metanólico demonstrou uma atividade antivírica eficaz pela redução de 2 log no dia 3 a 66,66 µg/ml, e pela redução entre 1-1,5 log no dia 6 com as concentrações 2,46 µg/ml e 7,4 µg/ml (Patente Europeia N.º 2389184 B1, 2012).

Desta forma, Bhatnagar *et al.* (2012) comprovou o potencial do extrato metanólico como antivírico. Atualmente esta patente encontra-se registada na Europa, China e Estados Unidos da América (Patente Europeia N.º 2389184 B1, 2012, Patente Chinesa N.º102361644 B, 2014, Patente Norte Americana N.º 9707261 B2, 2017).

Sood *et al.* (2015), a partir da constatação da patente anteriormente referida, investigou várias propriedades do extrato metanólico de *C. pareira* L. (extrato *Cipa*), a fim de desenvolver um potencial medicamento que abrangesse uma terapêutica paliativa e curativa simultânea.

Para averiguar se existia alguma época do ano que fosse mais adequada para a aquisição de *C. pareira* L., foram colhidas várias amostras desta planta medicinal em diferentes meses do ano de 4 regiões da Índia. Posteriormente procedeu-se à extração metanólica e fraccionamento da mesma em cinco frações distintas- hexano, clorofórmio, diclorometano, etil acetato e acetona. Após a determinação dos meses de

ano mais apropriados para colheita, determinou-se se haveria alguma variação entre as plantas medicinais das 4 regiões nos meses do ano anteriormente determinados (Sood *et al.*, 2015).

Assim, a análise inicial do extrato e frações demonstrou que as plantas medicinais colhidas entre os meses de abril a setembro apresentavam uma atividade antivírica mais pronunciada. A partir desta informação, ao avaliar as plantas medicinais das diferentes regiões colhidas entre abril e setembro, não se constataram diferenças na atividade antiviral (Sood *et al.*, 2015).

Relativamente à ação anti-DENV do extrato *Cipa* e das respectivas frações, apesar do fracionamento do extrato metabólico ter resultado numa atividade antivírica superior, traduzida por valores de concentração máxima inibitória para cada extrato e fração necessária para inibir 50% da infecção viral ( $IC_{50}$ ) inferiores (1,02-6,42  $\mu\text{g/ml}$  vs 7,12-21,38  $\mu\text{g/ml}$ ), o rendimento das frações foi inferior ao do extrato *Cipa* (0,22-3,44% vs 5,96-13,2%) (Sood *et al.*, 2015).

A cinética de inibição do extrato *Cipa* foi estudada a partir de células Vero previamente expostas ao serotipo 3 do vírus e sem pré incubação com o extrato *Cipa*. Os resultados indicaram que a inibição da secreção do antígeno NS1 é dose-dependente, uma vez que no 4º dia pós infecção doses baixas do extrato (22 e 66  $\mu\text{g/ml}$ ) inibiram a síntese de NS1, enquanto doses elevadas (200  $\mu\text{g/ml}$ ) mostraram-se eficazes no 2º dia pós infecção. A redução da carga viral, à semelhança da inibição da secreção do antígeno NS1, é igualmente dose-dependente (Sood *et al.*, 2015).

Para o estudo da eficácia *in vivo* do extrato *Cipa*, administrou-se por via intraperitoneal  $10^6$  UFP/0,4 ml de DENV-2 em ratinhos AG129 para determinação da dose mínima letal (DML), isto é, a dose necessária para desencadear manifestações clínicas e mais de 90% de óbitos em 3 a 4 semanas após administração. Seguidamente, os ratinhos AG129 foram divididos em três grupos de 6 elementos, onde se administrou por via oral 0,25% de metilcelulose, 125mg/kg ou 250mg/kg de extrato *Cipa* sem metanol. O tratamento foi iniciado 2 horas após infecção e a posologia consistiu em tomas de 12 em 12 horas durante 5 dias, sendo os ratinhos AG129 monitorizados por um período de 35 dias (Sood *et al.*, 2015).

A administração intraperitoneal revelou-se letal nos ratinhos AG129, em média, 25 dias após infecção em todos os grupos. No entanto, o tempo médio de sobrevivência verificado nos vários grupos revelou-se ser dose-dependente. Ou seja, no grupo onde se administrou 125 mg/kg de extrato *Cipa* sem metanol, sobreviveram 3 ratinhos e o tempo médio de sobrevivência fora de 28 dias, enquanto no grupo que recebera a maior dose, 4 ratinhos sobreviveram e o tempo médio de sobrevivência fora superior a 30 dias. Com estes resultados é possível corroborar que o extrato *Cipa* exerce um efeito protetor na infecção por DENV, podendo ser aumentado se se estender o tempo de tratamento (Sood *et al.*, 2015).

Devido ao facto de que no tratamento convencional na infecção por DENV é administrado Paracetamol, Sood *et al.* (2015) examinou se haveria alguma interação entre esta substância ativa e o extrato *Cipa*. Num ensaio PRNT *in vitro*, em células LLCMK2, constatou-se que à medida que a concentração de extrato *Cipa* aumentava, até 50 µg/ml, os efeitos inibitórios sobre o DENV-3 eram mais evidentes, onde se obteve um IC<sub>50</sub> de 6,1 µg/ml. Com a adição até 100 µg/ml de Paracetamol, não se verificou nenhuma interação entre esta substância ativa e o extrato *Cipa*. Isto é, o Paracetamol não atuava nem como antagonista nem como potenciador do efeito inibitório do extrato *Cipa*, mesmo com a obtenção de um IC<sub>50</sub> de 8,5 µg/ml com a adição de 100 µg/ml desta substância ativa. De forma a consolidar o significado destes resultados, comparou-se a contagem do número de placas na presença de Paracetamol a 100 µg/ml com DENV-3 e apenas na presença de DENV-3. Verificou-se que no primeiro caso eram 45±4 e no segundo 43±3. Já no ensaio *in vivo*, com ratinhos Wistar piréticos, observou-se que a administração concomitante de extrato *Cipa* com Paracetamol exercia um efeito sinérgico no tratamento da febre (Sood *et al.*, 2015).

Neste estudo fora efetuada uma análise sobre o efeito do extrato *Cipa* em eritrócitos e plaquetas, justificado pelas manifestações hemorrágicas características da patologia em questão. Após ensaios *ex vivo* e *in vivo* constatou-se que o extrato *Cipa* até 4 horas após exposição não exercia nenhum efeito indesejável sobre o número de plaquetas e eritrócitos (Sood *et al.*, 2015).

Outro parâmetro avaliado consistiu em avaliar se o extrato *Cipa* influenciava a secreção de citocinas inflamatórias, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e consequentemente pelos episódios hemorrágicos. Em células fagocitárias mononucleares humanas isoladas a partir de amostras séricas, a produção de

citoquinas inflamatórias fora instigada pela introdução de lipopolissacáridos de uma estirpe de *Escherichia coli*. A secreção de TNF- $\alpha$  e de interleucina-1 $\beta$  fora suprimida com IC<sub>50</sub> de 6,1  $\mu$ g/ml e 5,7  $\mu$ g/ml de extrato *Cipa*, respetivamente, o que demonstra a sua atividade anti inflamatória (Sood *et al.*, 2015).

Após este ensaio, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade do extrato *Cipa* em duas linhagens celulares, LLCMK2 e HepG2. Os resultados foram expressos na concentração máxima citotóxica de extrato vegetal necessária para inviabilizar 50% das células em estudo (CC<sub>50</sub>). No caso da linhagem celular HepG2 obteve-se um valor de 78,9  $\mu$ g/ml e para as células LLCMK2 superior a 200  $\mu$ g/ml. Ao comparar com o ensaio anterior e com a verificação da sinergia do extrato *Cipa* com Paracetamol, os valores de IC<sub>50</sub> determinados eram inferiores aos valores de CC<sub>50</sub>, o que demonstra que o extrato *Cipa* exerce um efeito anti inflamatório e antipirético sem efeitos citotóxicos (Sood *et al.*, 2015).

Por último realizou-se um ensaio toxicológico para avaliação de efeitos adversos do extrato *Cipa* em três grupos de 5 ratos Wistar adultos. Antes e após o ensaio monitorizaram-se parâmetros hematológicos, como hemoglobina, contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e hematócrito, e bioquímicos, como testes de função hepática, ureia, creatinina sérica e glicemia. Os resultados da análise toxicológica indicaram que até 2000 mg/kg de extrato *Cipa* não foram verificadas alterações significativas destes parâmetros em comparação com o grupo de administração de excipiente (Sood *et al.*, 2015).

Tendo em consideração as múltiplas atividades do extrato *Cipa* acima referidas, pode-se inferir que esta planta medicinal demonstra potencial para um futuro desenvolvimento de um medicamento à base de plantas, com uma formulação devidamente standardizada. Por este motivo, Bhatnagar *et al.* (2017) requiriu uma patente de uma formulação de extrato metanólico de partes aéreas e Paracetamol que se encontra em fase de aprovação pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WO 2017/103688 A1, 2017).



### 9.1.2 *Lycopersicon hirsutum* Dunal

*Lycopersicon hirsutum* Dunal (Figura 13), da família *Solanaceae*, é uma espécie selvagem de tomate proveniente da região dos Andes, Peru e Equador, com preferência para habitats húmidos (Blancard, 2013). Apesar de esta planta ser utilizada tradicionalmente pelas populações aborígenes do sul do Equador e do norte do Peru para situações de pânico, através da preparação de uma pasta para uso tópico com a planta inteira fresca ou seca, constatou-se também que a mesma possuía um mecanismo de proteção contra insetos herbívoros (Bussmann, Glenn, & Sharon, 2010; Witting-bissinger *et al.*, 2008). Devido a esta constatação, ao analisar os tricomas glandulares das folhas e caule e os respetivos compostos secretados, verificou-se que a existência de uma metil cetona, denominada 2-undecanona, é responsável pela proteção acima referida (Kennedy, 2003). Por este motivo, desenvolveu-se um repelente para uso tópico nos humanos, aprovado pela Agência de Proteção do Ambiente dos Estados Unidos da América (EPA) - BioUD<sup>®</sup> (HOMS LLC, Clayton, NC), doseado em 7,75% de 2-undecanona (Kennedy, 2003; The Plant List, 2013b; Witting-bissinger *et al.*, 2008).



**Figura 13:** Representação dos frutos de *Lycopersicon hirsutum* Dunal - 1 e 2- em comparação com o fruto de tomate de cultivo (*Lycopersicon esculentum* Mill) - 3. (Adaptada de: Blancard, 2013).

Segundo a EPA, em estudos de toxicologia, uma determinada substância pode ser classificada em quatro categorias, de I a IV, sendo a última utilizada para qualificar compostos muito pouco tóxicos e a primeira para o oposto. No caso do repelente BioUD<sup>®</sup>, é classificado como pertencendo à categoria IV em termos de toxicidade aguda via oral e inalatória, apresentando um valor de LD<sub>50</sub> superior a 5000 mg/kg e a 5,43 mg/l em ratos, respetivamente. Quanto à toxicidade dermatológica, demonstrou a

existência de prurido 72 horas após aplicação em coelhos e um valor de LD<sub>50</sub> em ratos superior a 2000 mg/kg, sendo classificado na categoria III. No caso de efeitos indesejáveis via oftalmológica, fora detetada uma ligeira irritação reversível em 7 dias em coelhos (United States Environmental Protection Agency, 2012).

Devido ao facto de este repelente, à semelhança dos anteriormente referidos, se destinar à aplicação via tópica na pele, efetuou-se um estudo de toxicidade durante 21 dias em coelhos, com quatro dosagens diferentes de 0, 30, 100 e 300 mg/kg aplicadas diariamente. Verificou-se que a dosagem sem efeitos observáveis (NOEL) em termos de prurido era de 100 mg/kg/dia e a dosagem mínima para despoletar efeitos observáveis (LOEL) para irritação moderada a severa era superior a 300 mg/kg/dia. O repelente BioUD<sup>®</sup> não apresentou ainda toxicidade mutagénica, teratogénica e maternal (United States Environmental Protection Agency, 2012).

Para aferir a eficácia do repelente BioUD<sup>®</sup>, Witting-Bissinger *et. al* (2008), comparou este repelente com duas formulações de 7% e de 15% de DEET contra os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* durante um intervalo de tempo entre 1 a 6 horas através de testes de contacto entre os mosquitos e os voluntários em condições laboratoriais (*arm-in-cage tests*). Os ensaios foram repetidos seis vezes utilizando quatro voluntários. Constatou-se que o repelente BioUD<sup>®</sup> é igualmente eficaz à formulação de 7% de DEET tanto contra *A. aegypti* (p= 0,84) como contra *A. albopictus* (p= 0,10). Porém, ao confrontar com a formulação de 15% de DEET, o repelente BioUD<sup>®</sup> apenas demonstrou uma eficácia semelhante na presença de *A. albopictus* (p= 0,10), sendo menos eficaz no ensaio com *A. aegypti* (p= 0,002) (Witting-bissinger *et al.*, 2008).

### 9.1.3 *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson

*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson, da família *Myrtaceae* e de nome comum eucalipto limão, é uma planta com dimensões compreendidas entre os 25 a 40 metros de altura (Carroll & Loye, 2006; Kew Royal Botanic Gardens, 2017). Existe em vários países, como Quênia, Estados Unidos da América, República

Dominicana e China. Apesar de esta planta ser nativa das regiões de New South Wales e Queensland, Austrália, na medicina tradicional chinesa, o óleo essencial das folhas é utilizado como repelente de mosquitos. Por este motivo, durante a década de 60 na China, constatou-se que após a realização da hidrodestilação dos óleos essenciais das folhas, o produto remanescente era mais eficaz como repelente de mosquitos do que o óleo essencial (Kew Royal Botanic Gardens, 2017; Lorenz, Maia, & Moore, 2013).

Esta evidência deve-se ao facto do processo referido provocar um aumento do teor do monoterpreno para-metano-3,8-diol (PMD) em relação ao óleo essencial, que contém entre 1 a 2% de PMD. A título de exemplo, para demonstrar a diferença de teores entre as duas formulações, retrata-se o caso do Citriodol<sup>®</sup>, repelente que se encontra disponível nos Estados Unidos da América e em avaliação pela Agência Europeia dos Produtos Químicos, e que contém um teor de PMD de 64% (Carroll & Loye, 2006; Citrefine International LTD, 2017; The Plant List, 2013a). A Figura 14 ilustra as folhas de *C. citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson.



**Figura 14:** Folhas de *C. citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson. (Retirado de: Kew Royal Botanic Gardens, 2017)

De acordo com a EPA, esta substância ativa é classificada na categoria IV quanto à toxicidade aguda via oral e cutânea, apresentando um LD<sub>50</sub> acima de 5000 mg/kg em ratos e coelhos, respetivamente. No entanto, é categorizada na categoria I relativamente à toxicidade oftalmológica, caso não seja devidamente tratado, podendo provocar danos corrosivos ao nível da córnea. Para averiguar possíveis efeitos indesejáveis com a aplicação a longo prazo, Rush (1997) efetuou um estudo de toxicidade durante 90 dias com PMD a 98,3% em 30 ratos Sprague-Dawley com três

doses diferentes de 0, 1000 e 3000 mg/kg durante 6 horas por dia. Constatou-se que a dose sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) era de 1000 mg/kg/dia e que a dose mínima para despoletar efeitos adversos (LOAEL) era de 3000 mg/kg/dia, onde se observou eritema, edema, escara e acantose (United States Environmental Protection Agency, 2000).

Com o intuito de investigar a eficácia do PMD, Carrol & Loye (2006) compararam a eficácia de quatro repelentes, que consistiam em 20% PMD, 10% PMD, 10% DEET e 30% DEET, contra o mosquito *A. aegypti* em 10 voluntários no total. De todos os indivíduos, 9 estiveram sujeitos à primeira formulação, 8 à segunda formulação, 1 com a terceira, 1 com a quarta e 1 como controlo negativo. O ensaio consistia em estar em contacto com o mosquito (*arm-in-cage tests*) durante 1 minuto, com intervalos de 30 minutos durante 8 horas. Constatou-se que para a formulação de 20% PMD, o tempo de proteção completo superou 5 horas, para a de 10% PMD fora inferior a 2 horas, para a de 10% DEET fora de 2 horas e para a de 30% DEET 8 horas. Ao mesmo tempo, verificou-se ainda que a redução da frequência de picadas entre a formulação de 20% PMD e de 30% DEET foram idênticas, em 99%, mas durante um curto período de tempo (Carroll & Loye, 2006).

## 10. CONCLUSÃO

Esta dissertação apresenta um panorama geral da infecção por vírus dengue, desde o seu surgimento até às medidas de combate atualmente disponíveis, expondo como método alternativo ao tratamento e profilaxias convencionais a utilização da fitoterapia ou de novos medicamentos de origem vegetal.

Atualmente, a doença provocada por DENV é considerada uma epidemia clássica do século XXI, uma vez que é transmitida por mosquitos adaptáveis a metrópoles de grandes dimensões, é influenciada pelas alterações climáticas que estimulam o desenvolvimento dos vetores e dissemina-se através da globalização. Por consequência, a propagação do vírus para países não afetados, tornando-os endêmicos, constitui um cenário contemporâneo.

De forma a mitigar ou eliminar a disseminação dos vetores e do vírus, torna-se necessária uma caracterização detalhada de ambos os fatores contribuintes para a doença em causa.

No caso dos vetores, em termos de ecologia e comportamento, o conhecimento do habitat preferencial, que se traduz em regiões quentes, húmidas e chuvosas, e dos focos reprodutivos das espécies, que consistem em reservatórios de água estagnada, permitiram a implementação de medidas de controlo químicas e biológicas. Contudo, principalmente devido ao desenvolvimento de resistências por parte dos artrópodes aos métodos químicos, técnica mais utilizada em países endêmicos, a erradicação dos mosquitos permanece um objetivo difícil de alcançar. Em acréscimo, uma vez que a maioria destes países contém escassos recursos humanos especializados e financeiros e são sobrepovoados, a criação de medidas educativas que permitam o controlo dos vetores e a eliminação dos focos reprodutivos é essencial.

Quanto ao vírus, a descrição da sua estrutura, metodologias de entrada e replicação na célula hospedeira e patogénese constituem fontes de interesse para um potencial desenvolvimento de terapêuticas antivíricas.

Pelos motivos anteriormente referidos, uma das estratégias para colmatar este paradigma consiste na aplicação de plantas medicinais, cujos compostos ativos são detentores de inúmeras atividades benéficas para a criação de estratégias antivíricas, de terapêuticas paliativas e de medidas de controlo dos vetores.

Das várias plantas medicinais retratadas nesta dissertação, a que demonstra maior potencial para o desenvolvimento de um medicamento antivírico é *Cissampelos*

*pareira* Linn. O extrato metanólico das partes aéreas desta planta medicinal, que contém na sua constituição cissampeloflavona e vários alcalóides, possui propriedades antivíricas como inibidor da entrada do vírus, da replicação viral e da secreção da NS1. A redução simultânea da carga viral e da produção da NS1 permite mitigar o grau de infecção ao mesmo tempo que previne o aparecimento de derrame vascular, por inibição da lise celular e da libertação de citocinas inflamatórias. Ao inibir a secreção de citocinas inflamatórias, o extrato metanólico exerce uma ação anti inflamatória e antipirética. A última ação farmacológica é ainda potenciada na presença de Paracetamol, o que demonstra o potencial terapêutico da associação entre esta substância ativa e o extrato metanólico. Em concomitância com as características anteriormente referidas, o extrato metanólico não apresenta toxicidade hematológica, renal e hepática. Assim, a associação entre o extrato metanólico de *C. pareira* L. e Paracetamol constitui um potencial candidato a ensaios pré clínicos e clínicos. No entanto, para formular um medicamento à base de plantas estandarizado, é necessária uma caracterização mais aprofundada dos compostos ativos constituintes do extrato metanólico.

Para a atividade repelente existem várias opções baseadas em plantas, sendo a que apresenta melhores resultados consiste na *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson, uma vez que o composto ativo existente, PMD, apresenta uma eficácia satisfatória face ao padrão de excelência dos repelentes, o DEET, para além de que acarreta menos riscos aquando da sua aplicação.

Desta forma, a necessidade de pesquisar e desenvolver formulações que não acarretem risco de utilização para o Homem e para o ambiente é urgente.

Em suma, a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias antivíricas e antivetoriais em fitoterapia e fitoquímica é uma área em crescimento, que num futuro próximo poderá providenciar novas estratégias de combate à infecção por DENV para além das medidas existentes.

## BIBLIOGRAFIA

- Abd Kadir, S. L., Yaakob, H., & Mohamed Zulkifli, R. (2013). Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *Journal of Natural Medicines*, 67(4), 677–689. <https://doi.org/10.1007/s11418-013-0767-y>
- Achee, N. L., Gould, F., Perkins, T. A., Reiner, R. C., Morrison, A. C., Ritchie, S. A., ... Scott, T. W. (2015). A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Almeida, A., Galão, R., Sousa, C., Novo, M., Parreira, R., Pinto, J., ... Esteves, A. (2008). Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), 823–832. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.011>
- Almeida, A., Gonçalves, Y., Novo, M., Sousa, C., Melim, M., & Grácio, A. (2007). Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Eurosurveillance*, 12(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.2807/esw.12.46.03311-en>
- Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Ludueña, S. J., Lía, I., Gamarnik, A. V, Lodeiro, F., & Luduen, S. J. (2005). Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *Journal of Virology*, 79(11), 6631–6643. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6631>
- Alves, M. J., Fernandes, P. L., Amaro, F., Osório, H., Luz, T., Parreira, P., ... Zeller, H. (2013). Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira Island, Portugal, October 2012. *Eurosurveillance*, 18(6), 3–6.

- Alves, M. J., Zé-Zé, L., Amaro, F., & Osório, H. (2016). REVIVE 2011-2015 - Culicídeos e Ixodídeos : Rede de Vigilância de Vetores. In I. N. de S. D. R. Jorge (Ed.) (pp. 9–31). Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.
- Amresh, G., Zeashan, H., Rao, C. V., & Singh, P. N. (2007). Prostaglandin mediated anti-inflammatory and analgesic activity of *Cissampelos pareira*. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 49, 153–160. Retrieved from [http://www.actapharmsci.com/uploads/pdf/pdf\\_113.pdf](http://www.actapharmsci.com/uploads/pdf/pdf_113.pdf)
- Añez, G., & Rios, M. (2013). Dengue in the united states of america: A worsening scenario? *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/678645>
- Angel, R. M. de, & Valle, J. R. del. (2013). Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathogens*, 9(10), 9–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003551>
- Araújo, J. M. G. de, Bello, G., Schatzmayr, H. G., Santos, F. B. dos, & Nogueira, R. M. R. (2009). Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), 526–529. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547883>
- Bäck, A. T., & Lundkvist, Å. (2013). Dengue viruses – an overview. *Infection Ecology & Epidemiology*, 3(1), 19839. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>
- Benarroch, D., Selisko, B., Locatelli, G. A., Maga, G., Romette, J. L., & Canard, B. (2004). The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg<sup>2+</sup>-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*, 328(2), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.004>
- Benelli, G., Jeffries, C. L., & Walker, T. (2016). Biological control of mosquito vectors: Past, present, and future. *Insects*, 7(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/insects7040052>
- Bhatnagar, P. K., Katiyar, C. K., Khanna, N., Tyagi, P., Upadhyay, D. J., Swaminathan, S., ... Rajerethinam, R. (2017). *WO 2017/103688 A1*. Suíça: World Intellectual Property Organization International Bureau.



- Bhatnagar, P. K., Katiyar, C. K., Khanna, N., Upadhyay, D. J., Swaminathan, S., Srinivas, K., ... Raut, R. (2012). *Patente Europeia N.º 2389184 B1*. União Europeia: Patent Office.
- Bhatnagar, P. K., Katiyar, C. K., Khanna, N., Upadhyay, D. J., Swaminathan, S., Srinivas, K., ... Raut, R. (2014). *Patente Chinesa N.º 102361644 B*. China: Patent and Trademark Office.
- Bhatnagar, P. K., Katiyar, C. K., Khanna, N., Upadhyay, D. J., Swaminathan, S., Srinivas, K., ... Raut, R. (2017). *Patente Norte Americana N.º 9707261 B2*. Estados Unidos da América: Patent and Trademark Office.
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., & Moyes, C. (2013). The global distribution and burden of dengue. *NIH-PA Author Manuscript Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.The
- Bilal, H., Hassan, S. A., & Khan, I. A. (2012). Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: Suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4), 298–300. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60026-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60026-4)
- Blancard, D. (2013). The Tomato Plant and its Culture. In J. Fletcher (Ed.), *A color handbook:tomato diseases identification, biology and control* (2<sup>a</sup>, pp. 17–34). Waltham e San Diego, EUA: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387737-6.50001-7>
- Bussmann, R. W., Glenn, A., & Sharon, D. (2010). Healing the body and soul: Traditional remedies for “magical” ailments, nervous system and psychosomatic disorders in Northern Peru. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(September), 580–629.
- Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2016). Properties and functions of the dengue virus capsid. *NI*, 97(12), 5421–5433. <https://doi.org/10.1002/jps.21372>.Interactions
- Canard, B. (2011). Antiviral research and development against dengue virus. *WHO Report*, 1–101.Disponível em [http://www.who.int/tdr/research/ntd/dengue/dengue\\_full\\_length\\_report.pdf](http://www.who.int/tdr/research/ntd/dengue/dengue_full_length_report.pdf)

- Carroll, S. P., & Loye, J. (2006). PMD , a registered botanical mosquito repellent with deet- like efficacy, 22(3), 507–514. [http://dx.doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[507:PARBMR\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[507:PARBMR]2.0.CO;2)
- CDC. (2006). Female of *Aedes aegypti*. Consultado em 30 de dezembro de 2017. Disponível em <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=9261>
- CDC. (2012a). Dengue and the *Aedes aegypti* mosquito. *Centers for Disease Control and Prevention Fact Sheet*, 2. Disponível em <https://www.cdc.gov/dengue/resources/30jan2012/aegyptifactsheet.pdf>
- CDC. (2012b). Dengue and the *Aedes albopictus* mosquito. *Centers for Disease Control and Prevention Fact Sheet*. Disponível em [www.cdc.gov/dengue/resources/30Jan2012/albopictusfactsheet.pdf](http://www.cdc.gov/dengue/resources/30Jan2012/albopictusfactsheet.pdf)
- CDC. (2012c). Mosquito life-cycle. Consultado a 26 de agosto de 2017. Disponível em [https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m\\_lifecycle.html](https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/m_lifecycle.html)
- CDC. (2014). Flaviviridae. Consultado a 5 de setembro de 2017. Disponível em <https://www.cdc.gov/vhf/virus-families/flaviviridae.html>
- CDC. (2017a). Avoid dengue by preventing mosquito bites. Consultado a 18 de janeiro de 2018. Disponível em <https://www.cdc.gov/features/avoid-dengue/index.html>
- CDC. (2017b). Laboratory guidance and diagnostic testing. Consultado a 12 de novembro de 2017. Disponível em <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>
- Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*, 3(9), 1562–1608. <https://doi.org/10.3390/v3091562>
- Citrefine International LTD. (2017). Citriodol®: nature's most effective insect repellent. Consultado a 23 de fevereiro de 2018. Disponível em <https://www.citrefine.com/citriodiol/#supply>
- Clemons, A., Haugen, M., Flannery, E., Tomchaney, M., Kast, K., Jacowski, C., ... Duman-Scheel, M. (2010). *Aedes aegypti*: an emerging model for vector mosquito development. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(10).

<https://doi.org/10.1101/pdb.emo141>

- Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23), 11418–11431. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- Da Silveira Oliveira, A. F. C., Teixeira, R. R., De Oliveira, A. S., De Souza, A. P. M., Da Silva, M. L., De Paula, S. O., & Schmidt, T. J. (2017). Potential antivirals: natural products targeting replication enzymes of dengue and Chikungunya viruses. *Molecules*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030505>
- Dallimore, T., Hunter, T., Medlock, J. M., Vaux, A. G. C., Harbach, R. E., & Strode, C. (2017). Discovery of a single male *Aedes aegypti* (L.) in Merseyside, England. *Parasites & Vectors*, 10(1), 309. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2251-0>
- De Carvalho, I. L., Rocha, D. K., & Almeida, A. P. G. (2011). Immune reactivity to dengue and *Aedes albopictus* mosquitoes in the population from Macao, China, before dengue occurrence. *In Vivo*, 25(4), 625–631. <https://doi.org/25/4/625> [pii]
- De Oliveira, A. S., Da Silva, M. L., Oliveira, A. F. C. S., Da Silva, C. C., Teixeira, R. R., & De Paula, S. O. (2014). NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(10), 1759–1769. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140057>
- DGS. (2012a). Orientação nº 014/2012: Abordagem de casos de dengue. *Direção-Geral Da Saúde*, 1–21.
- DGS. (2012b). Orientação nº 018/2012: Luta anti vetorial contra *Aedes aegypti*. *Direção-Geral Da Saúde*, 1–4.
- Dhar, R., & Kumar, N. (2003). Role of mosquito salivary glands. *Curr Sci*, 85(9), 1308–1313.
- Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2015). Molecular insight into dengue virus

- pathogenesis and its implications for disease control. *Cell*, 162(3), 488–492. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.005>
- Díaz-Nieto, L. M., Chiappero, M. B., Díaz de Astarloa, C., Maciá, A., Gardenal, C. N., & Berón, C. M. (2016). Genetic evidence of expansion by passive transport of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Eastern Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(9), 10–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004839>
- Dieng, H., Saifur, R. G. M., Ahmad, A. H., Che Salmah, M. R., Aziz, A. T., Satho, T., ... Morales, R. E. (2012). Unusual developing sites of dengue vectors and potential epidemiological implications. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 228–232. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60047-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60047-1)
- Domanovic, D., Jain, R., Payne, L., Mantero, J., Marrama, L., Robesyn, E., ... Falcão, I. M. (2012). Rapid risk assessment autochthonous dengue cases in consulted experts main conclusions and recommendations disease background information dengue virus. *ECDC, Technical Report*, (October), 8.
- Doucoure, S., & Drame, P. M. (2015). Salivary biomarkers in the control of mosquito-borne diseases. *Insects*, 6(4), 961–976. <https://doi.org/10.3390/insects6040961>
- Dwivedi, V. D., Tripathi, I. P., Tripathi, R. C., Bharadwaj, S., & Mishra, S. K. (2017). Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Briefings in Functional Genomics*, 16(4), 217–227. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elw040>
- Entomology Today. (2017). Neighborhood watch: how asian tiger mosquito habitat varies from block to block in an urban setting. Consultado a 30 de agosto de 2017. Disponível em <https://entomologytoday.org/2017/06/14/neighborhood-watch-how-asian-tiger-mosquito-habitat-varies-from-block-to-block-in-an-urban-setting/>
- Esteves, A., & Parreira, R. (2014). Togavírus e flavivírus. In A. Meliço-Silvestre, H. Barroso, & N. Taveira (Eds.), *Microbiologia médica volume 2* (pp. 182–198). Lisboa, Portugal: Lidel.
- European Center for Disease Prevention and Control. (2016a). *Aedes aegypti*-factsheet for experts. Consultado a 21 de agosto de 2017. Disponível em <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-aegypti>

- European Center for Disease Prevention and Control. (2016b). *Aedes albopictus*-factsheet for experts. Consultado a 30 de agosto de 2017. Disponível em <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-albopictus>
- European Center for Disease Prevention and Control. (2017). Exotic mosquitoes: surveillance map. Consultado a 21 de agosto de 2017. Disponível em <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>
- Faheem, M., Raheel, U., Riaz, M. N., Kanwal, N., Javed, F., Us Sahar Sadaf Zaidi, N., & Qadri, I. (2011). A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. *Molecular Biology Reports*, 38(6), 3731–3740. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0488-1>
- Gervais, J. A., Wegner, P., Luukinen, B., Buhl, K., & Stone, D. (2009). Picaridin technical fact sheet. Consultado a 19 de janeiro de 2018. Disponível em <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/Picaridintech.html>
- Goodsell, D. (2008). Molecule of the month: dengue virus. Consultado a 4 de outubro de 2017. Disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=103>
- Grunnill, M., & Boots, M. (2016). How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *Journal of Medical Entomology*, 53(1), 1–19. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv168>
- Grupo Medinfar. (2017). Conheça a nova gama PREVIPIQ®. Consultado a 19 de janeiro de 2018. Disponível em <http://www.medinfar.pt/categoria/noticias/page/2/>
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480–496. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12483-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12483-7)
- Gubler, D. J. (2008). Dengue viruses. In B. W. J. Mahy & M. H. V van Regenmortel (Eds.), *Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology* (pp. 372–382). Oxford, Inglaterra: Elsevier Academic Press. Disponível em [http://www.gmu.ac.ir/download/booklibrary/e-library/Desk Encyclopedia of HUMAN AND MEDICAL VIROLOGY.pdf](http://www.gmu.ac.ir/download/booklibrary/e-library/Desk%20Encyclopedia%20of%20HUMAN%20AND%20MEDICAL%20VIROLOGY.pdf)

- Guo, C., Zhou, Z., Wen, Z., Liu, Y., Zeng, C., Xiao, D., ... Yang, G. (2017). Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>
- Guzman, A., & Istúriz, R. E. (2010). Update on the global spread of dengue. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(SUPPL. 1), S40–S42. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018>
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Nathan, M. B., ... Yoksan, S. (2010). Dengue : a continuing global threat Europe PMC Funders Author Manuscripts. *Nat Rev Microbiol*, 8(12 0), S7–16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460.Dengue>
- Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385(9966), 453–465. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9Seminar](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9Seminar)
- Hartman, K. (2011). Animal diversity web: *Aedes albopictus*. Consultado a 30 de agosto de 2017. Disponível em [http://animaldiversity.org/accounts/Aedes\\_albopictus](http://animaldiversity.org/accounts/Aedes_albopictus)
- Henchal, E. A., & Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(4), 376–396. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.4.376.Updated>
- Higa, Y. (2011). Dengue Vectors and their Spatial Distribution. *Tropical Medicine and Health*, 39(4SUPPLEMENT), S17–S27. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S04>
- Iberoquímica magistral. (2016). Repelente MERCK IR 3535®: repelente de insetos de alta performance. Consultado a 19 de janeiro de 2018. Disponível em <http://iberoquimica.com.br/Arquivos/Insumo/arquivo-113152.pdf>
- Idrees, S., & Ashfaq, U. A. (2012). A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genetic Vaccines and Therapy*, 10(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-10-6>
- Iglesias, N. G., & Gamarnik, A. V. (2011). Dynamic RNA structures in the dengue virus genome. *RNA Biology*, 8(2), 249–257. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14992>

- Instituto de Higiene e Medicina Tropical. (s.d.). Prevenção da picada de insetos. Consultado a 19 de janeiro de 2018. Disponível em <http://www.ihmt.unl.pt/consulta-do-viajante/prevencao-da-picada-de-insetos/>
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2017). Instituto Ricardo Jorge identifica pela primeira vez em Portugal espécie de mosquito *Aedes albopictus*. Consultado a 2 de outubro de 2017. Disponível em <http://www.insa.min-saude.pt/instituto-ricardo-jorge-identifica-pela-primeira-vez-em-portugal-especie-de-mosquito-aedes-albopictus/>
- Iowa State University. (2017). *Aedes albopictus* bugguide. Consultado a 2 de outubro de 2017. Disponível em <https://bugguide.net/node/view/727874/bgimage>
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., & O'Neill, S. L. (2011). Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, 12(6), 508–518. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>
- Jansen, C. C., & Beebe, N. W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*, 12(4), 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.011>
- Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., & Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(8), 1411–1418. <https://doi.org/10.1086/383043>
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4294–4313. <https://doi.org/10.3390/v6114294>
- Kalayanarooj, S., Gibbons, R. V., Vaughn, D., Green, S., Nisalak, A., Jarman, R. G., ... Perng, G. (2007). Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(7), 1014–1017. <https://doi.org/10.1086/512244>
- Katzelnick, L. C., Coloma, J., & Harris, E. (2017). Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(3), e88–e100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30473-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30473-X)

- Kennedy, G. G. (2003). Tomato,pests,parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112733>
- Kew Royal Botanic Gardens. (2017). *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson. Consultado a 23 de fevereiro de 2018. Disponível em <http://plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:986336-1>
- Klema, V. J., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2015). Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses*, 7(8), 4640–4656. <https://doi.org/10.3390/v7082837>
- Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000646>
- Leal, W. S. (2014). The enigmatic reception of DEET - the gold standard of insect repellents. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.10.007>
- Lorenz, L. M., Maia, M. F., & Moore, S. J. (2013). The use of plants in vector control. In M. M. Cameron & L. M. Lorenz (Eds.), *Biological and Environmental Control of Disease Vectors* (pp. 42–67). Wallingford, Inglaterra: CABI. Disponível em [https://books.google.pt/books?id=KbdXmKZfXUIC&pg=PA49&lpg=PA49&dq=corymbia+citriodora+chinese+medicinal+use&source=bl&ots=8IJj\\_yIDvJ&sig=QtHY3xQ6hIHkKDkxYIpUk1G-5Tw&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjO\\_9fmt7zZAhXlzlKkHSCPBdKQ6AEIZTAK#v=onepage&q=corymbia+citriodor](https://books.google.pt/books?id=KbdXmKZfXUIC&pg=PA49&lpg=PA49&dq=corymbia+citriodora+chinese+medicinal+use&source=bl&ots=8IJj_yIDvJ&sig=QtHY3xQ6hIHkKDkxYIpUk1G-5Tw&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjO_9fmt7zZAhXlzlKkHSCPBdKQ6AEIZTAK#v=onepage&q=corymbia+citriodor)
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>
- Martins, V. E. P., Alencar, C. H., Kamimura, Michel Toth de Carvalho Araújo, F. M., de Simone, S. G., Dutra, R. F., & Guedes, M. I. F. (2012). Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS ONE*, 7(7), 1–9.



<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041386>

- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2016). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Tropica*, 166(November), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
- Mehboob, M., Nouroz, F., & Noreen, S. (2015). Natural and Herbal Remedies for Dengue Prevention. Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/288324252\\_Natural\\_and\\_Herbal\\_Remedies\\_for\\_Dengue\\_Prevention](https://www.researchgate.net/publication/288324252_Natural_and_Herbal_Remedies_for_Dengue_Prevention)
- Mitra, A. K., & Mawson, A. R. (2017). Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2(3), 36. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2030036>
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., & Failloux, A. B. (2012). The native wolbachia symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>
- Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): a new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.011>
- Neto, P. L., & Navarro-Silva, M. a. (2004). Systematics , morphology and physiology development , longevity , gonotrophic cycle and oviposition of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) under cyclic temperatures. *Neotropical Entomology*, 33(February), 29–33. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000100006>
- Nolan, T., Tharmaphornpilas, P., Farrar, J., Amarasinghe, A., Barrett, A., Durbin, A., ... Vannice, K. (2016). Background paper on dengue vaccines. *World Health Organization*, (March), 67. Disponível em [http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/april/1\\_Background\\_Paper\\_Dengue\\_Vaccines\\_2016\\_03\\_17.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/april/1_Background_Paper_Dengue_Vaccines_2016_03_17.pdf)
- Oliva, C. F., Damiens, D., & Benedict, M. Q. (2014). Male reproductive biology of

- Aedes* mosquitoes. *Acta Tropica*, 132(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.021>
- Pakistan Agricultural Research Council. (2016). Azad Jammu Kashmir Medicinal & Aromatic Plants Herbarium photo gallery. Consultado a 12 de janeiro de 2018. Disponível em <http://www.flora.parc.gov.pk/index.php/pic?start=40>
- Pan American Health Organization. (2017). Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. *Pan American Health Organization*. Disponível em <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/33895>
- Pang, T., Mak, T. K., & Gubler, D. J. (2017). Prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(3), e79–e87. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30471-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30471-6)
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. In *Microbes and Infection. A Journal on Infectious Agents and Host Defenses* (Vol. 11, pp. 1177–1185). Issy Les Moulineaux, França: Elsevier Masson SAS.
- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegriño, J. L., Buchy, P., Cardoso, M. J., Devi, S., ... Yoksan, S. (2010). Evaluation of diagnostic tests: Dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S30–S38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- Proença da Cunha, A., José Teixeira, F., Pereira da Silva, A., & Rodrigues Roque, O. de L. (2010). Plantas medicinais e medicamentos à base de plantas. In *Plantas na terapêutica: Farmacologia e ensaios clínicos* (2ª Edição, pp. 15–36). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Pubchem. (s.d.a). Icaridin. Consultado a 19 de janeiro de 2018. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Icaridin#section=Top>
- Pubchem. (s.d.b). N,N-Diethyl-3-methylbenzamide. Consultado a 19 de janeiro de 2018. Disponível em [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N\\_N-Diethyl-3-methylbenzamide#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_N-Diethyl-3-methylbenzamide#section=Top)
- Pyke, A. T., Moore, P. R., Taylor, C. T., Hall-Mendelin, S., Cameron, J. N., Hewitson, G. R., ... Van Den Hurk, A. F. (2016). Highly divergent dengue virus type 1

- genotype sets a new distance record. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22356>
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2012). Fármacos que afetam os grandes sistemas de órgãos: o coração. In *Farmacologia* (7ª Edição, pp. 246–264). Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier Churchill Livingstone.
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Rey, J. R. (2014). Dengue in Florida (USA). *Insects*, 5(4), 991–1000. <https://doi.org/10.3390/insects5040991>
- Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174(2), 479–493. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90102-W](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90102-W)
- Rico-Hesse, R. (2007). Dengue virus evolution and virulence models. *Clinical Infectious Diseases*, 44(11), 1462–1466. <https://doi.org/10.1086/517587>
- Rios, L., & Maruniak, J. E. (2014). *Aedes albopictus*- asian tiger mosquito: University of Florida. Consultado a 22 de agosto de 2017. Disponível em [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/asian\\_tiger.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/asian_tiger.htm)
- Rocha, D. K., Matosc, O., Novoa, M. T., Figueiredo, A. C., Delgado, M., Moiteiro, C., ... C., M. (2015). Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. *Natural Product Communications*, 10(4), 677–682. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Sahili, A. El, & Lescar, J. (2017). Dengue virus non-structural protein 5. *Viruses*, 9(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v9040091>
- Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>
- Sanofi Pasteur. (s.d.). Dengue vaccine registered in 19 Countries. Consultado a 15 de

- novembro de 2017. Disponível em <http://dengue.info/dengue-vaccine-registered-in-19-countries/>
- Sanofi Pasteur. (2016). Sanofi Pasteur Dengue Vaccine Frequently Asked Questions. *Sanofi Pasteur*, pp. 1–4.
- Santacoloma, L., Chaves, B., & Brochero, H. L. (2012). Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en 13 localidades de Colombia. *Biomédica*, 32(3), 333–343. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.680>
- Schaffner, F., & Mathis, A. (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European region: Past, present, and scenarios for the future. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(12), 1271–1280. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70834-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70834-5)
- Scholte, E. J., & Schaffner, F. (2007). Waiting for the tiger: Establishment and spread of the Asian tiger mosquito in Europe. In W. Takken & B. Knols (Eds.), *Emerging Pests and Vector-Borne Diseases in Europe* (Vol. 1, pp. 241–260). Wageningen, Holanda: Wageningen Academic Publishers.
- Scott, T., Morrison, A., Lorenz, L., Clark, G., Strickman, D., Kittayapong, P., ... Edman, J. (2000). Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in Thailand and Puerto Rico : population dynamics longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in Thailand and Puerto Rico : Population Dynamics. *J Med Entomol*, 37(1), 77–88. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.1.77>
- Scott, T. W., & Morrison, A. C. (2010). Vector dynamics and transmission of dengue virus: implications for dengue surveillance and prevention strategies. In A. Rothman (Ed.), *Dengue Virus. Current topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 338, pp. 115–128). Berlin, Alemanha: Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02215-9>
- Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/nri3916>
- Shah, K., Qureshi, S. S., Gupta, J. K., Upmanyu, N., & Chauhan, N. S. (2017).

- Medicinal Plants and its Therapeutic Uses Ethnomedicinal Uses , Phytochemistry and Pharmacology of *Cissampelos pareira* : A Review. In B. Kshetrimayum (Ed.), *Medicinal Plants and its Therapeutic Uses* (pp. 99–113). Foster City, Estados Unidos da América: OMICS International. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4172/978-1-63278-074-4-075>
- Sharp, T. M., Perez-Padilla, J., & Waterman, S. H. (2017). Dengue. In G. W. Brunette (Ed.), *CDC Yellow Book 2018:Health Information for International Travel*. Nova Iorque, EUA: Oxford University Press. Disponível em <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/dengue>
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., Vinh Chau, N. van, & Wills, B. (2012). Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366, 1423–1432. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMra1110265>
- Sood, R., Raut, R., Tyagi, P., Pareek, P. K., Barman, T. K., Singhal, S., ... Khanna, N. (2015). *Cissampelos pareira* Linn: natural source of potent antiviral activity against all four dengue virus serotypes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004255>
- Soumahoro, M.-K., Fontenille, D., Tubelin, C., Pelat, C., Boyd, A., Flahault, A., & Hanslik, T. (2010). Imported chikungunya virus infection. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 162–163. <https://doi.org/10.3201/eid1601.080776>
- Sowilem, M. M., Kamal, H. A., & Khater, E. I. (2013). Life table characteristics of *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine*, 30(2), 301–314.
- Srikiatkachorn, A., Rothman, A. L., Gibbons, R. V., Sittisombut, N., Malasit, P., Ennis, F. A., ... Kalayanarooj, S. (2011). Dengue-how best to classify it. *Clinical Infectious Diseases*, 53(6), 563–567. <https://doi.org/10.1093/cid/cir451>
- Summers, B. (2016). *Dengue: The Hunt For a Vaccine*. Filipinas: Rockhopper Productions, Ltd.
- Teixeira Gomes, E. (2005). Etnobotânica e etnofarmacologia. In A. Proença da Cunha (Ed.), *Farmacognosia e Fitoquímica* (pp. 37–55). Lisboa: Fundação Calouste

Gulbenkian.

The Plant List. (2013a). *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D.Hill & L.A.S.Johnson. Consultado a 13 de janeiro de 2018. Disponível em <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-47992>

The Plant List. (2013b). *Lycopersicon hirsutum* Dunal. Consultado a 13 de janeiro de 2018. Disponível em <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-29600178>

Toledo, J., George, L., Martinez, E., Lazaro, A., Han, W. W., Coelho, G. E., ... Horstick, O. (2016). Relevance of non-communicable comorbidities for the development of the severe forms of dengue: a systematic literature review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004284>

Toxicology Data Network. (2010). HSDB: temephos. Consultado a 26 de novembro de 2017. Disponível em <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+956>

United States Environmental Protection Agency. (2000). *p-Menthane-3,8-diol (011550) biopesticide registration eligibility document*. Washington D.C., EUA.

United States Environmental Protection Agency. (2012). *Preliminary work plan and summary document registration review*. Washington D.C., EUA.

Vasilakis, Nikos; J. Shell, Elisabeth; B. Fokan, Eric; W. Mason, Peter; A. Hanley, Kathryn; Estes, D. Marco; C. Weaver, S. (2013). Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to... [Virology. 2007] - PubMed - NCBI, 358(2), 402–412. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.049>.Potential

Vasilakis, N., Fokan, E. B., Hanson, C. T., Weinberg, E., Sall, A. A., Whitehead, S. S., ... Weaver, S. C. (2013). Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains. *Virology*, 377(2), 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.044>.Genetic

Virus Pathogen Database and Analysis Resource. (2017). Dengue. Consultado a 4 de outubro de 2017. Disponível em [https://www.viprbrc.org/brc/vipr\\_genome\\_search.spg?method=SubmitForm&dec](https://www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?method=SubmitForm&dec)

- orator=flavi\_dengue&sortBy=getFlaviSubtypeOrder(organism.name, taxon.name, strain.subType)&sortOrder=asc&selectionContext=1507114430183&pageTo=1
- Wang, B., Li, Y., Feng, Y., Zhou, H., Liang, Y., Dai, J., ... Xia, X. (2015). Phylogenetic analysis of dengue virus reveals the high relatedness between imported and local strains during the 2013 dengue outbreak in Yunnan, China: a retrospective analysis. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0908-x>
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, a D., Watowich, S. J., Gubler, D. J., & Weaver, S. C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of Virology*, 74(7), 3227–3234. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3227-3234.2000>
- Watts, D., Burke, D., Harrison, B., Whitmire, R., & Nisalak, A. (1987). Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(1), 143–152.
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>. Present
- Weaver, S., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue virus. *Infect Genet Evol*, 9(4), 523–540. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>. Molecular
- WHO. (s.d.a). Dengue control-The mosquito: World Health Organization. Consultado a 22 de agosto de 2017. Disponível em <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/>
- WHO. (s.d.b). Dengue control epidemiology: World Health Organization. Consultado a 21 de outubro de 2017. Disponível em <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>
- WHO. (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *World Health Organization*, (pp 1-149) Geneva.
- WHO. (2012a). Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020. *World Health Organization*, (pp 1-43). <https://doi.org/entity/denguecontrol/9789241504034/en/index.html>

- WHO. (2012b). *Handbook for clinical management of dengue*. World Health Organization. Disponível em [http://www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Handbook+for+Clinical+Management+of+dengue#1%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Handbook+for+cli](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Handbook+for+Clinical+Management+of+dengue#1%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Handbook+for+cli)
- WHO. (2017). Dengue and severe dengue: World Health Organization. Consultado a 22 de outubro de 2017. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Witting-bissinger, A. B. E., Stumpf, C. F., Donohue, K. V, Roe, R. M., Witting-Bissinger, B. E., & Apperson, C. S. (2008). Novel arthropod repellent , BioUD , is an efficacious alternative to deet. *Journal of Medical Entomology*, 45(5), 891–898. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[891:NARBIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[891:NARBIA]2.0.CO;2)
- Xavier, D. R., Magalhães, M. de A. F. M., Gracie, R., Reis, I. C. dos, Matos, V. P. de, & Barcellos, C. (2017). Difusão espaço-tempo do dengue no Município do Rio de Janeiro, Brasil, no período de 2000-2013. *Cadernos de Saúde Pública*, 33(2), 1–13. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00186615>
- Xiao, F.-Z., Zhang, Y., Deng, Y.-Q., He, S., Xie, H.-G., Zhou, X.-N., & Yan, Y.-S. (2014). The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. *Archives of Virology*, 159(11), 3053–3057. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2051-1>
- Zettel, C., & Kaufman, P. (2016). *Aedes aegypti*-yellow fever mosquito: University of Florida. Consultado a 22 de agosto de 2017. Disponível em [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/AQUATIC/aedes\\_aegypti.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/AQUATIC/aedes_aegypti.htm)